

Die Rolle von Proteasomen in der Antigenpräsentation in der Coxsackievirus B3 induzierten akuten und chronischen Myokarditis

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Biologin Sandra Jäkel

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
2. Prof. Dr. Hermann-Georg Holzhütter
3. Prof. Dr. Thomas Sommer

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2010

Abstract (de)

Der Großteil MHC Klasse I restringierter Epitope wird bei der Proteindegradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System generiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) in der Antigenpräsentation in einer Coxsackievirus B3 (CVB3) induzierten akuten und chronischen Myokarditis untersucht.

Für *in vitro* Degradationsexperimente mit isolierten 20S Proteasomen wurden CVB3 Polypeptide synthetisiert und die Degradationsprodukte massenspektrometrisch analysiert. Eine erhöhte Substratumsatzrate und eine Verschiebung von Schnittpräferenzen durch Immunoproteasomen oder unter dem Einfluss von PA28 führten zu einer verbesserten Generierung immunrelevanter CVB3 Fragmente.

Inflammatorische Kardiomyopathien können in Mäusen durch eine CVB3 Infektion ausgelöst werden. Resistente Stämme (C57BL/6) eliminieren das Virus vollständig, in anfälligen Mäusen (A.BY/SnJ) erfolgt keine vollständige Elimination. In Herzen gesunder Mäuse werden vorwiegend konstitutive 20S Proteasomen exprimiert. Eine myokardiale Entzündung, ausgelöst durch eine CVB3 Infektion, führte in den Herzen beider Mausstämmen zu der Bildung von Immunoproteasomen, was zu einer gesteigerten Generierung immunrelevanter CVB3 Fragmente führte. Die größte Menge immunrelevanter Fragmente wurden durch Proteasomen gebildet, die am Tag vier aus den Herzen akut erkrankender C57BL/6 Mäuse und am Tag acht aus chronisch erkrankenden A.BY/SnJ Mäusen isoliert wurden. Dies korrelierte mit der Inkorporation von Immununtereinheiten in *de novo* assemblierende Proteasomen und einer unterschiedlichen Interferon Typ I Kinetik. In Geweben lymphatischen Ursprungs hingegen waren Zusammensetzung und proteolytische Aktivität der Proteasomen im Verlauf der Infektion in beiden Mausstämmen unverändert.

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung einer zeitlich optimalen IFN Sekretion an der Infektionsstelle, die zu der Anpassung des UPS an die inflammatorischen Bedingungen führt.

Schlagwörter: Antigenprozessierung, 20S Proteasom, PA28, Coxsackievirus B3, Myokarditis, dilatative Kardiomyopathie

Abstract (en)

The recognition of viral antigens bound to major histocompatibility complex (MHC) class I molecules by CD8⁺ T cells is crucial for virus elimination. Most MHC class I restricted antigenic peptides are produced by the Ubiquitin-Proteasome-System (UPS). In the present study, the impact of the UPS in antigen presentation during Coxsackievirus B3 (CVB3) induced acute and chronic myocarditis has been investigated.

To examine whether the proteasome is involved in the generation of MHC class I ligands derived from the CVB3 polyprotein, polypeptides were synthesized for *in vitro* processing by 20S proteasomes. Mass spectrometry analysis demonstrated an enhanced generation of immunorelevant CVB3 fragments due to an increased substrate degradation rate and altered cleavage site preferences by immunoproteasomes or in the presence of PA28.

Murine models of CVB3 induced myocarditis mimic human disease pattern with diverse outcomes. Permissive mice (A.BY/SnJ) develop chronic myocarditis with cardiac CVB3 persistence whereas resistant mice (C57BL/6) recover and eliminate the virus after acute infection. Constitutive 20S proteasomes are mainly expressed in hearts of healthy mice. Myocardial inflammation, caused by a CVB3 infection, resulted in immunoproteasome formation in hearts of both, resistant C57BL/6 and susceptible A.BY/SnJ mice, and was correlated with enhanced generation of immunorelevant CVB3 peptides. In concurrence with distinctive type I interferon kinetics, immunoproteasome formation and improved epitope generation peaked on day 4 post infection in resistant mice, and was delayed in susceptible mice. No alterations were observed in assembly and proteolytic activity of 20S proteasomes in lymphatic tissues during CVB3 infection, independent from mouse strain.

The results emphasise the impact of a rapid adjustment of the UPS to viral infection due to early secretion of type I interferon at site of infection.

Keywords: antigen processing, 20S proteasome, PA28, Coxsackievirus B3, myocarditis, dilatative cardiomyopathy

Inhaltsverzeichnis

Abstract (de)	I
Abstract (en)	II
1 Einleitung	2
1.1 Das Immunsystem	2
1.2 Die Präsentation von Antigenen	3
1.3 Die Generierung von Antigenen durch das Ubiquitin-Proteasom-System	5
1.3.1 Struktur und proteolytische Aktivität von 20S Proteasomen	6
1.3.2 Der Proteasomenaktivator PA28	9
1.4 Coxsackievirus B3 induzierte Myokarditis.....	12
1.5 Die experimentelle Myokarditis.....	13
1.6 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Geräte	16
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	16
2.3 Zellkultur.....	18
2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	18
2.3.2 Einfrieren und Auftauen.....	20
2.4 Mausmodell	21
2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	21
2.5.1 Herstellen von Zell- und Gewebelysaten	21
2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	22
2.5.3 Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen.....	22
2.5.4 Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen.....	23
2.5.5 Western Blot und Proteindetektion.....	23
2.5.6 Immunpräzipitation	24
2.5.7 Bestimmung der proteolytischen Aktivität von 20S Proteasomen	25
2.5.8 Isolation von 20S Proteasomen	26
2.5.9 Isolation von PA28 aus MEC29 PA28 Zellen	27
2.5.10 <i>in vitro</i> Degradation von synthetischen Polypeptiden.....	28
	IV

2.6	Immunologische Methoden	30
2.6.1	Bestimmung der Bindungseigenschaften potentieller CVB3 Epitope	30
2.6.2	Analyse antigenspezifischer T Zellantworten.....	33
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	35
2.7.1	Isolation von Gesamt-RNA.....	35
2.7.2	Die Synthese von cDNA.....	35
2.7.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
2.7.4	Elektrophoretische Trennung von DNA.....	36
2.7.5	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	37
2.7.6	Transformation von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) mit Plasmid-DNA	37
2.7.7	Reinigung von GST-Fusionsproteinen	38
2.8	Software und Datenbanken.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Computerbasierte Vorhersagen H-2 ^b -restringierter Epitope aus CVB3.....	41
3.2	Generierung potentieller CVB3 T Zellepitope durch 20S Proteasomen.....	42
3.2.1	Degradation von CVB3 Polypeptiden durch Standard- und Immunoproteasomen.....	44
3.2.2	Einfluss der Immununtereinheiten auf die Substratabbaurate und die Fragmentgenerierung	47
3.2.3	Einfluss des Proteasomenaktivators PA28 auf die Substratabbaurate und Generierung immunrelevanter Fragmente.....	51
3.3	Struktur- und Funktionsanalyse von 20S Proteasomen aus Organen.....	55
3.3.1	Zusammensetzung von 20S Proteasomen in Organen	55
3.3.2	Funktionelle Analyse der 20S Proteasomen aus Organen.....	58
3.4	Zusammensetzung von 20S Proteasomen und PA28 in Kardiomyozyten.....	65
3.4.1	Einfluss von Typ I und II IFN auf die Struktur von 20S Proteasomen	65
3.4.2	Einfluss von poly (I:C) auf die Struktur von 20S Proteasomen	67
3.5	Bestimmung der Immunrelevanz potentieller CVB3 Epitope.....	69
3.5.1	MHC Klasse I Bindung und Stabilisierung	69
3.5.2	Proliferationstest.....	71
3.5.3	Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer T Zellen	74

4	Diskussion.....	77
4.1	Die Identifikation H-2 ^b -restringierter CVB3 Epitope	77
4.1.1	Bindungseigenschaften vorhergesagter H-2 ^b -restringierter CVB3 Epitope.....	77
4.1.2	Die Reaktivität der vorhergesagten CVB3 Epitope	79
4.2	Die Rolle von Immunoproteasomen bei der Generierung potentieller CVB3 Epitope	82
4.3	Die Rolle von PA28 bei der Generierung potentieller CVB3 Epitope.....	85
4.4	Die Rolle von Kardiomyozyten in der Antigenpräsentation in einer CVB3 Infektion.....	87
4.5	Antigenprozessierung durch 20S Proteasomen in der CVB3 Infektion.....	88
	Literaturverzeichnis.....	93
	Abkürzungsverzeichnis.....	104
	Anhang.....	106

Zusammenfassung

Voraussetzung für die Aktivierung von CD8⁺ T Zellen ist die Antigenerkennung durch die Interaktion des T Zellrezeptors mit dem Peptid-MHC-Komplex. MHC-Klasse I restringierte Peptide sind vorwiegend das Produkt der proteasomenvermittelten Degradation zytosolischer Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Antigenprozessierung während einer Cocksackievirus B3 induzierten akuten und chronischen Myokarditis untersucht.

Eine erhöhte Substratumsatzrate und die Verschiebung von Schnittpräferenzen, zugunsten von Schnitten nach hydrophoben und basischen Aminosäuren, führten in *in vitro* Degradationsexperimenten zu einer verbesserten Generierung immunrelevanter Fragmente aus Cocksackievirus B3 Polypeptidsubstraten durch Immunoproteasomen. In Anwesenheit des Proteasomenaktivators PA28 konnte eine weitere Steigerung der Substratumsatzrate beobachtet werden, die unabhängig vom Typ assoziierter 20S Proteasomen war. Von den untersuchten potentiellen H-2^b-restringierten Cocksackievirus B3 Epitopen konnte für das Peptid CVB3 VP2_[285-293] *ex vivo* eine Reaktivität von CD8⁺ T Zellen aus infizierten C57BL/6 Mäusen nachgewiesen werden. Die Zahl der epitopspezifischen CD8⁺ T Zellen lässt auf ein subdominantes Epitop schließen.

Eine myokardiale Entzündung, ausgelöst durch eine Infektion mit Cocksackievirus B3, führte in den Herzen von C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen zu der Induktion der Expression der Immununtereinheiten und deren Inkorporation in 20S Proteasomen. In C57BL/6 Mäusen, die eine akute Myokarditis entwickeln, wurde das Maximum inkorporierter Immununtereinheiten am Tag vier, in den chronisch erkrankenden A.BY/SnJ Mäusen am Tag acht nach Infektion beobachtet. Die generierte Menge potentieller Cocksackievirus B3 Epitope war abhängig von der inkorporierten Menge an Immununtereinheiten in 20S Proteasomen. Isolierte 20S Proteasomen aus Herzen der resistenten C57BL/6 Mäuse generierten die größte Menge immunrelevanter Fragmente am Tag vier, für 20S Proteasomen aus Herzen der anfälligen A.BY/SnJ Mäuse wurde eine zeitliche Verschiebung zum Tag acht nach Infektion beobachtet. In der Milz waren die Immununtereinheiten bereits vor einer Infektion in 20S Proteasomen inkorporiert. Im Verlauf der Infektion waren Zusammensetzung und proteolytische Aktivität der Proteasomen in beiden Mausstämmen unverändert. Die Assoziation von 20S Proteasomen mit PA28 erhöhte sich unter dem Einfluss von IFN sowohl in Zellen lymphatischen als auch nicht-lymphatischen Ursprungs. *In vitro* konnte die Expression der Immununtereinheiten und von PA28 α und PA28 β in Kardiomyozyten durch IFN- β und IFN- γ und durch Stimulation mit poly (I:C) erreicht werden.

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung einer zeitlich optimalen IFN Sekretion, die zur Induktion der Komponenten des MHC Klasse I Präsentationsweges und der Anpassung des Ubiquitin-Proteasom-Systems an die inflammatorischen Bedingungen führt, und somit einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Infektion hat.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem höherer Vertebraten ist ein effizientes Netzwerk verschiedener Mechanismen, das Schutz vor Schädigungen und Infektionen gewährleistet. Ein komplexes System humoraler und zellulärer Mechanismen der angeborenen und der adaptiven Immunität ermöglicht Detektion und Abwehr verschiedener Pathogene. Die erste Antwort gegen eindringende Pathogene nach Überwindung mechanischer Barrieren ist die angeborene Immunantwort. Sie basiert auf der Detektion von *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) durch extra- und intrazelluläre *pathogen recognition receptors* (PRR). Dazu gehören *toll like receptors* (TLR), die Proteinkinase R (PKR) und *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD) Proteine (Akira 2006). Diese Rezeptoren sind auf konservierte pathogenassoziierte Muster restringiert. Im Gegensatz dazu bieten die Rezeptoren der B und T Zellen, die die humorale und zelluläre adaptive Immunantwort vermitteln, eine hohe Diversität. Aber nur eine jeweils kleine Zahl von Rezeptoren ist spezifisch für ein bestimmtes Antigen. Nach Aktivierung antigenspezifischer Zellen kommt es zur klonalen Expansion und damit zur Vermehrung der Zahl antigenspezifischer Zellen (Harari 2006). Diese klonale Expansion und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses sind die Grundlage der adaptiven Immunität. Schutz gegen extrazelluläre Pathogene oder Toxine bieten Antikörper, die durch B Zellen sezerniert werden. Schutz vor intrazellulären Mikroorganismen wird hauptsächlich durch T Zellen vermittelt.

T Zellen erkennen ein Antigen nur, wenn dieses über *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I oder II Moleküle präsentiert wird (MHC Restriktion). Der T Zellrezeptor (TcR) interagiert mit dem MHC-Peptid-Komplex und bildet gemeinsam mit CD3 und ζ den TcR Komplex. Je nach Klasse der Korezeptoren unterscheidet man $CD4^+$ oder $CD8^+$ T Zellen. Der TcR Komplex $CD8^+$ T Zellen interagiert mit MHC Klasse I Molekülen, der TcR Komplex $CD4^+$ T Zellen mit MHC Klasse II Molekülen. Nach der antigenvermittelten Aktivierung werden Proliferation und Differenzierung naiver T Zellen in T Effektorzellen ausgelöst. $CD4^+$ T Effektorzellen (T Helferzellen) vermitteln über die Sekretion von Zytokinen die Aktivierung von $CD8^+$ T Zellen, B Zellen und Makrophagen. $CD8^+$ T Effektorzellen (zytotoxische T Zellen) töten infizierte Zellen. Die Lyse der Zielzelle kann durch die Induktion von Apoptose, entweder Perforin- und Granzym- oder durch Fas-Fas-Ligand-Interaktion vermittelt, verursacht werden. Diese zytolytische Aktivität erfordert einen direkten Zell-Zell-Kontakt. Der Tod der Zielzelle kann auch indirekt durch die Sekretion von $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ ausgelöst werden (Andersen 2006).

1.2 Die Präsentation von Antigenen

MHC Klasse I Moleküle sind heterodimere Moleküle, die aus einer invarianten schweren α -Kette und dem nicht kovalent gebundenen β_2 Mikroglobulin bestehen. Sie werden auf kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren Peptide zytosolischen Ursprungs. Murine MHC Klasse I Moleküle werden als *histocompatibility-2* (H-2) bezeichnet. Die extrazellulären Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ der schweren Kette des MHC Moleküls bilden die Bindungstasche, die an beiden Enden geschlossen ist, und so die Länge des Liganden bestimmen (Bjorkman 1987). Die Spezifität wird durch die Aminosäuren determiniert, die in den Taschen der Bindungsgrube liegen und die mit den Aminosäuren der bindenden Peptide interagieren, den sogenannten Ankerresten. Peptide, die stabil an MHC Klasse I Moleküle binden, müssen daher die korrekte Länge haben und über die passenden Ankerreste verfügen, um die maximal mögliche Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen einzugehen (Elliott 2005). Durch Peptidbindung induzierte Konformationsänderungen des MHC Moleküls ermöglichen eine stabile Bindung (Springer 1998). Nicht allein die Ankerreste der antigenen Determinanten nehmen Einfluss auf die Stabilität der Bindung, sondern auch benachbarte Aminosäuren (Rammensee 1995). Die Stärke der Bindung beeinflusst das Präsentationsniveau eines Peptids. In der Regel binden immundominante Epitope hochaffin (Sijts 1994), aber nicht alle hochaffin bindenden Epitope sind gleichzeitig immundominant (Wipke 1993). Die Aktivierung einer naiven CD8⁺ T Zelle ist abhängig von der Präsentationsdichte des Antigens auf der Zelloberfläche der präsentierenden Zelle, und für die Aktivierung muß ein bestimmter Schwellenwert engagierter TcRs überschritten werden (Lanzavecchia 2000).

Der Großteil MHC Klasse I restringierter Epitope wird bei der Degradation intrazellulärer Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System generiert. Während einer Infektion mit intrazellulären Pathogenen werden neben zelleigenen auch Proteine der Erreger prozessiert, die nach einer Infektion Bestandteil des intrazellulären Peptidpools sind (Pamer 1998).

Über den *transporter associated with antigen presentation* (TAP1/TAP2 Heterodimer) werden die generierten Peptide ATP-abhängig aus dem Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. TAP Transporter sind Bestandteil des Peptidladungskomplexes (*peptide loading complex*), der die Beladung von MHC Klasse I Molekülen mit Peptiden gewährleistet. Nach Assemblierung der Peptid-MHC-Komplexe werden diese über den Golgi Apparat an die Zelloberfläche transportiert (Abb. 1-1) (Elliott 2005). Neben dem Bindungsmotiv des MHC Klasse I Moleküls kann die Selektivität des TAP Transporters die Präsentation eines Epitops

beeinflussen. Es werden Peptide mit einer Länge von 7 bis 16 Aminosäuren transportiert (Momburg 1994). Die Affinität des Transporters wird, unabhängig von der Peptidlänge, von den drei N-terminalen und der C-terminalen Aminosäure determiniert. Murine TAP Transporter interagieren mit hydrophoben Aminosäuren des C-Terminus des Peptids. Prolin an den drei N-terminalen Positionen wirkt destabilisierend und reduziert die Translokationswahrscheinlichkeit (Uebel 1997; Burgevin 2008; Neefjes 1995).

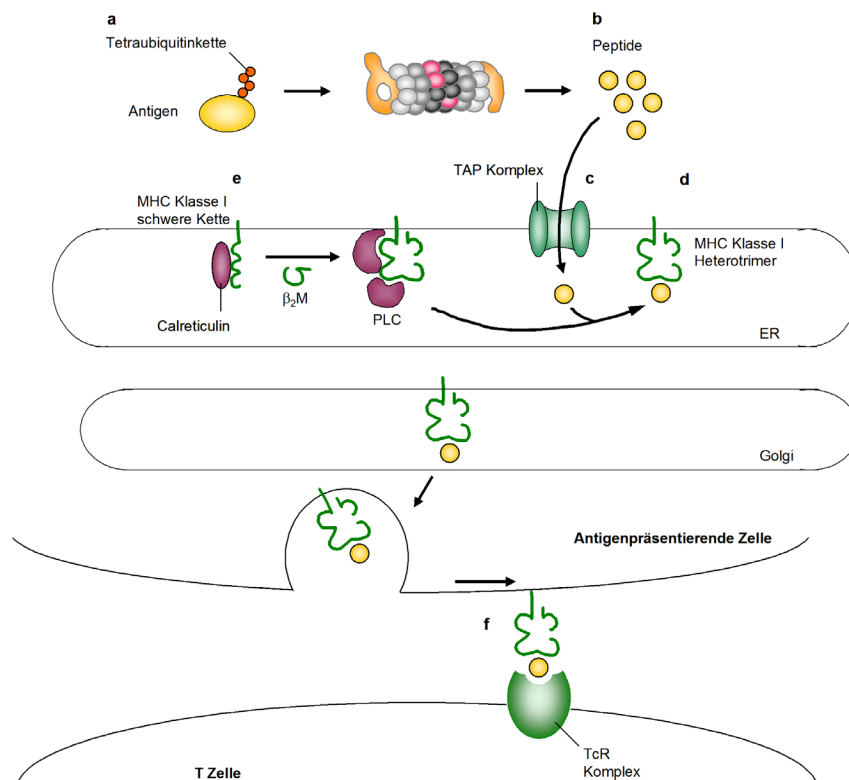


Abb. 1-1. Antigengenerierung und -präsentation. a) Die Markierung von Proteinen mit einer Polyubiquitinkette führt zur Degradation durch das 26S Proteasom und damit b) zur Generierung von Peptiden. c) Epitope oder deren Vorläuferpeptide, die N-terminales Trimming erforderlich machen, werden durch den TAP in das ER transportiert. d) Die Bindung an e) MHC Klasse I Heterodimere unter Beteiligung von Proteinen des Peptidladungskomplexes (PLC) führt zur Stabilisierung der MHC Komplexe. Die heterotrimeren Moleküle werden über den Golgi Apparat an die Zelloberfläche transportiert. f) Die Interaktion der MHC-Peptid-Komplexe mit dem TcR antigenspezifischer T Zellen führt zur Aktivierung CD8+ T Zellen (modifiziert nach Kloetzel 2001).

1.3 Die Generierung von Antigenen durch das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System gewährleistet durch die kontrollierte und selektive Proteolyse die Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostase. Es ist an verschiedenen zellulären Prozessen wie Transkription, Zellteilung, Entwicklung und Differenzierung, Apoptose und Antigenprozessierung beteiligt. Eine wichtige Rolle bei der kontrollierten Degradation spielt die Markierung von Proteinen mit Ubiquitin, das in einem mehrstufigen Prozess auf das Substrat übertragen wird. Unter ATP-Verbrauch wird eine Thioesterbindung zwischen der Carboxylgruppe des C-terminalen Glycins von Ubiquitin und dem E1 Enzym (*ubiquitin activating enzyme*) gebildet. Nach der Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf ein E2 Enzym (*ubiquitin conjugating protein*) erfolgt der Transfer auf das Substrat durch ein E3 Enzym (*ubiquitin protein ligase*). Dabei wird eine Amidbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins des Substrates gebildet. Die Wiederholung dieser Kaskade führt zu der Bildung von Polyubiquitinketten, deren Ubiquitinmoleküle durch Isopeptidbindungen zwischen der ϵ -Aminogruppe des Lysins 48 und der Carboxylgruppe des Glycins 76 verknüpft sind (K48-G76) (Hershko 1998). Für die Degradation des Substrates durch Proteasomen ist eine Markierung mindestens mit Tetraubiquitin notwendig (Thrower 2000). Die Markierung von Proteinen mit Ubiquitin hat auch Bedeutung bei der Vermittlung nicht-proteolytischer Prozesse. Substratmonoubiquitinierung oder -multiubiquitinierung sind Signale für die Endozytose. Die Verknüpfung von Polyubiquitinketten über Lysin 29 oder 63 spielt eine Rolle in der Signaltransduktion, DNA-Replikation, der postreplikativen DNA-Reparatur und in der Modulation von Protein-Protein-Interaktionen (Weissman 2001).

Der ATP-abhängige Abbau polyubiquitinerter Proteine erfolgt durch 26S oder 30S Proteasomen, die aus einem 20S *core* Partikel bestehen, an dessen Ende ein 19S Regulator assoziiert ist (26S), oder an dessen Enden jeweils ein 19S Regulator (30S) assoziiert ist (Liu 2006). Untereinheiten des 19S Regulators sorgen für die Erkennung und Bindung polyubiquitinerter Substrate, und für die Deubiquitinierung, Entfaltung und Translokation der Substrate in das Innere des 20S *core* Partikels. Der 19S Komplex kann in *base* und *lid* Subkomplexe unterteilt werden. Der *base* Komplex besteht aus sechs ringförmig angeordneten ATPasen (Rpt1 bis 6), die mit dem 20S *core* Partikel interagieren, und zwei nicht-ATPasen (S1/Rpn2 und S2/Rpn1). Der *lid* Komplex besteht aus den Untereinheiten Rpn3, Rpn5 bis 9 und Rpn11 und Rpn12. Rpn10 bindet sowohl an den *base* als auch an den *lid* Komplex, und trägt so zur stabilen Assoziation beider 19S Subkomplexe bei. Neben Rpn10 bindet Rpt5 polyubiquitinierte Substrate (Pickart 2004).

1.3.1 Struktur und proteolytische Aktivität von 20S Proteasomen

Das 20S Proteasom ist eine multikatalytische Protease (Dahlmann 1985; Wilk 1983). Für die Aufklärung der Struktur eukaryotischer 20S Proteasomen war die Aufklärung der Struktur des 20S Proteasoms aus dem Archaeabakterium *Thermoplasma acidophilum* (*T. acidophilum*) maßgeblich. Vier heptamere Ringe bilden gestapelt einen zylinderförmigen Komplex. Dabei bilden α -Untereinheiten die beiden äußeren, β -Untereinheiten die beiden inneren Ringe. In *T. acidophilum* bestehen die α - und β -Ringe jeweils aus sieben gleichen α - und sieben gleichen β -Untereinheiten ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$) (Löwe 1995). Die Ringe der 20S Proteasomen aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) bestehen aus sieben verschiedenen α - und sieben verschiedenen β -Untereinheiten ($\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$) (Abb. 1-2). Im Inneren der 20S Proteasomen ergibt sich eine dreifache Kompartimentierung, bei der die β -Untereinheiten die zentrale Kammer und die α - und β -Untereinheiten jeweils gemeinsam zwei Vorkammern bilden (Groll 1997). Im Gegensatz zu Archaea- und Eubakterien ist der Zugang zu den inneren Kavitäten durch die N-Termini der Untereinheiten α_1 , α_2 , α_3 , α_6 und α_7 verschlossen (Groll 2000).

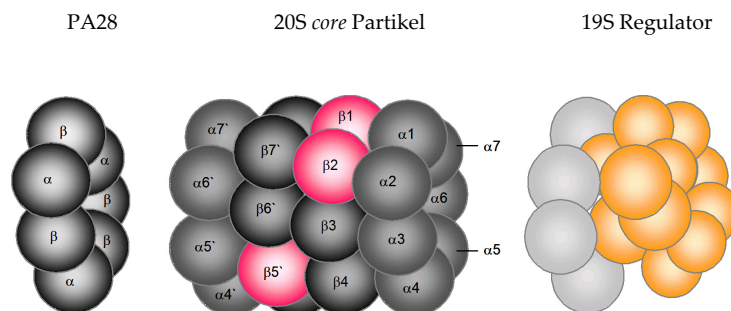


Abb. 1-2. PA28, 20S core Partikel und 19S Regulator. Der 20S core Partikel (Mitte) besteht aus 28 Untereinheiten, die gestapelt einen zylinderförmigen Komplex bilden. Die beiden äußeren Ringe bestehen aus sieben α -Untereinheiten, deren N-Termini in Eukaryoten den Zugang zu den inneren Kavitäten verschliessen. Die beiden inneren heptameren β -Ringe enthalten je drei katalytische Untereinheiten: β_1 , β_2 und β_5 (pink). Die α - und β -Untereinheiten des Proteasomenaktivators PA28 (links) bilden einen heptameren Ring mit $\alpha_3\beta_4$ Stöchiometrie, der mit den α -Untereinheiten des 20S core Partikels interagiert. Der 19S Regulator (rechts) besteht aus dem base Komplex (hellgrau), der die Assoziation an das 20S Proteasom vermittelt, und dem lid Komplex (orange), der die mit Ubiquitin markierten Substrate bindet (modifiziert nach Kloetzel 2004; Kloetzel 2001).

Das Proteasom gehört zu der Klasse der N-terminal nukleophilen Hydrolasen. Drei der sieben β -Untereinheiten tragen ein Threonin an ihrem N-Terminus und sind proteolytisch aktiv: β_1 , β_2 und β_5 . Die Hydroxylgruppen der Threonine fungieren als Nukleophil und ragen in das Innere des 20S core Partikels. Kompartimentierung, kontrollierter Substratzugang und die Ausrichtung der proteolytischen Aktivität in das Innere des 20S core Partikels verhindern die unkontrollierte

Degradation zellulärer Proteine. Schutz vor unkontrollierter Proteolyse bietet außerdem die Synthese und Inkorporation der katalytischen Untereinheiten als inaktive Vorläufer. Die Prozessierung der Propeptide erfolgt nach Assemblierung durch Autokatalyse (Baumeister 1998; Chen 1996; Schmidtke 1996). Mit kleinen fluorogenen Peptidsubstraten konnten den katalytischen Untereinheiten durch Mutationsanalysen und Inhibitorstudien in *S. cerevisiae* Präferenzen der peptidspaltenden Aktivität zugeordnet werden: Die Untereinheit $\beta 1$ schneidet bevorzugt nach sauren Aminosäuren. Sie vermittelt die peptidylglutamylpeptidhydrolysierende Aktivität (PGPH). $\beta 2$ schneidet C-terminal von basischen Aminosäuren und vermittelt die trypsinähnliche Aktivität. Die Untereinheit $\beta 5$ hydrolysiert Peptidbindungen nach hydrophoben Resten und wird als chymotrypsinähnliche Aktivität bezeichnet (Groll 1997; Groll 2004; Dick 1998). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten und der hohen Sequenzhomologie geht man davon aus, dass die Ergebnisse der Analysen mit 20S Proteasomen aus *S. cerevisiae* auf die 20S Proteasomen höherer Eukaryoten übertragbar sind (Orlowski 2000). Allerdings stimmt diese strikte Zuteilung der proteolytischen Aktivität zu bestimmten katalytischen Untereinheiten bei längeren, physiologisch relevanten Peptidsubstraten nicht (Kisselev 1999; Kuckelkorn 1995; Schmidtke 1998). Die hydrolysierende Aktivität der katalytischen Untereinheiten ist überlappend und beeinflusst mehr als ein fluorogenes Substrat (Eleuteri 1997; Schmidtke 1998). Benachbarte β -Untereinheiten beeinflussen die Spaltspezifität ebenso wie die Aminosäuresequenz der Substrate. Das Schnittverhalten des Proteasoms wird durch die Sequenz des Epitops und durch die Sequenz epitopflankierender Regionen beeinflusst (Orlowski 2000; Niedermann 1995; Beekman 2000; Theobald 1998).

In Proteasomen höherer Eukaryoten gibt es neben den drei konstitutiven katalytischen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ drei interferoninduzierbare katalytische Untereinheiten, die entsprechend ihrer konstitutiven Homologe als $\beta 1i$ (LMP2; *low-molecular-weight protein 2*), $\beta 2i$ (MECL-1; *multicata-lytic endopeptidase complex-like-1*) und $\beta 5i$ (LMP7; *low-molecular-weight protein 7*) bezeichnet werden. Zusammengefasst werden sie unter der Bezeichnung Immunountereinheiten. Diese werden kooperativ in neu assemblierende 20S Proteasomen eingebaut und ersetzen die konstitutiven katalytischen Untereinheiten (Aki 1994; Groettrup 1997).

Die Inkorporation der Immunountereinheiten in 20S *core* Partikel bedingt eine Veränderung der Peptidaseaktivität. Untersuchungen mit kleinen fluorogenen Peptidsubstraten führten zu unterschiedlichen Ergebnissen (Driscoll 1993; Gaczynska 1993; Kuckelkorn 1995; Boes 1994). Die Folge der Inkorporation einer Immunountereinheit kann jedoch nicht einfach mit der Veränderung einer einzelnen hydrolysierenden Aktivität beschrieben werden (Kuckelkorn 1995).

Untersuchungen mit längeren Polypeptidsubstraten belegen, dass sich das Schnittverhalten von Immunoproteasomen zugunsten von Schnitten nach hydrophoben und basischen Aminosäuren verändert (Goldberg 2002). Diese Aminosäuren dienen haplotypabhängig häufig als C-terminale Ankerreste der Peptide bei der Bindung an MHC Klasse I Moleküle. Das hat zu der Annahme geführt, dass Immunoproteasomen zu einer effizienteren Epitopgenerierung beitragen (Kloetzel 2004). Dabei wird der C-Terminus der Epitope in der Regel proteasomal generiert. Der N-Terminus dagegen ist weniger stark definiert und häufig verlängert. Das macht ein N-terminales Trimming durch zytosolische oder ER-ständige Aminopeptidasen erforderlich (Reits 2004; Cascio 2001; Beninga 1998).

Für viele Epitope viralen Ursprungs wurde tatsächlich ein positiver Effekt von Immunoproteasomen auf die Generierung von Epitopen oder deren N-terminal verlängerten Vorläuferpeptiden festgestellt. Als Beispiel seien die Epitope HA₃₅₄₋₃₆₂ und HA₂₅₉₋₂₆₆ aus Influenza A, das Epitop HBcAg₁₄₁₋₁₅₁ des Hepatitis B Virus, das Epitop E1B₁₉₂₋₂₀₀ aus Adenovirus Typ 5, das Epitop NP₁₁₈₋₁₂₆ aus dem lymphozytären Choriomeningitisvirus und ein Epitop aus dem gagL Protein des murinen Leukämievirus genannt (Sibille 1995; Sijts 2000a; Shin 2006; Sijts 2000b; Schwarz 2000b; van Hall 2000). Keinen Einfluss hingegen zeigte die Inkorporation der Immunountereinheiten auf die Generierung eines Epitops aus dem env Protein des murinen Leukämievirus (van Hall 2000). Für die Selbst-Antigene RU₁₃₄₋₄₂, Melan-A₂₆₋₃₅, gp100₂₀₉₋₂₁₇ wurde eine Generierung durch Standardproteasomen nachgewiesen, nicht aber durch Immunoproteasomen (Morel 2000).

Die verbesserte Generierung von Epitopen oder deren N-terminal verlängerten Vorläuferpeptiden kann sowohl auf die Erhöhung der Substratumsatzrate als auch auf die Veränderung der Schnittpräferenzen von Immunoproteasomen zurückzuführen sein. Fraglich ist, ob sich dabei lediglich die Quantität oder auch die Qualität generierter Fragmente ändert. *In vitro* Degradationsexperimente von denaturierter Enolase-I durch Standard- und Immunoproteasomen zeigten eine qualitative Veränderung der Schnittpräferenzen der Immunoproteasomen, was zu einem veränderten Produktspektrum führte (Toes 2001). Für das E1B₁₉₂₋₂₀₀ Epitop aus Adenovirus Typ 5 hingegen konnte gezeigt werden, dass sich nicht die Qualität der Schnitte verändert, sondern die Frequenz, mit der die Schnittstellen genutzt werden. Bei Einsatz von Immunoproteasomen fanden eine Erhöhung der Substratumsatzrate und eine Verschiebung der Schnittpräferenzen zugunsten der Generierung des Epitops statt. Dieses wurde also auch durch Standardproteasomen generiert, aber langsamer (Sijts 2000b). Bei der Korrelation generierter Epitope oder N-terminal verlängerter Epitopvorläufer mit definierten, parallel generierten

substratinternen Fragmenten konnte eine Verschiebung der Schnittpräferenz zugunsten immunrelevanter Fragmente nachgewiesen werden (Strehl 2008).

Ferner werden Immunoproteasomen viermal schneller gebildet als Standardproteasomen (Heink 2005). In der Antigenpräsentation ist die Verfügbarkeit von Peptiden limitierend (Benham 1997). Entscheidend für die Effizienz der Immunantwort sind die Kinetik und die Dichte, mit der ein Epitop auf der Zelloberfläche erscheint (Deol 2007; Lanzavecchia 2000). Mit den strukturellen und funktionellen Veränderungen von 20S Proteasomen während der Inflammation wird eine effiziente Anpassung an die Bedingungen einer Infektion erreicht. Wichtig ist diese enge Verknüpfung zwischen Infektion und der Anpassung vor allem am Ort der Infektion. Für die Elimination infizierter Hepatozyten nach einer Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* ist die Induktion der Immununtereinheiten und deren Inkorporation in 20S Proteasomen essentiell (Strehl 2006). Die beobachtete kürzere Halbwertszeit von Immunoproteasomen erlaubt es der Zelle aber auch, schnell wieder in den Normalzustand zurückzukehren (Heink 2005).

1.3.2 Der Proteasomenaktivator PA28

Neben dem 19S Regulator kann auch der Proteasomenaktivator PA28 mit dem 20S Proteasom assoziieren und eine Öffnung des 20S *core* Partikels vermitteln (Ma 1992; Dubiel 1992). Während 26S und 30S Proteasomen ubiquitinierte Proteine degradieren, erhöht PA28 die Hydrolyse von Peptiden ubiquitin- und ATP-unabhängig, und ist nicht an der Degradation von Proteinen beteiligt (Dubiel 1992).

PA28 besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, α und β , deren Expression durch Interferon- γ (IFN- γ) induziert werden kann (Realini 1994). Drei α - und vier β -Untereinheiten bilden einen heptameren Ring ($\alpha_3\beta_4$) (Knowlton 1997). Die C-terminalen Aminosäuren der Untereinheiten des PA28 Homologs aus *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), PA26, liegen in einer geordneten Struktur vor (Förster 2005) und inserieren in Taschen zwischen den α -Untereinheiten von 20S Proteasomen (Abb. 1-3) (Song 1997; Whitby 2000). Für eine Öffnung des Zugangs zu den inneren Kavitäten sind diese Interaktionen allein nicht ausreichend, ursächlich ist vielmehr eine Aktivierungsschleife. Aminosäuren dieser Aktivierungsschleife verursachen eine Destabilisierung der geschlossenen Konformation und eine Stabilisierung der offenen Konformation von 20S Proteasomen (Zhang 1998; Förster 2005).

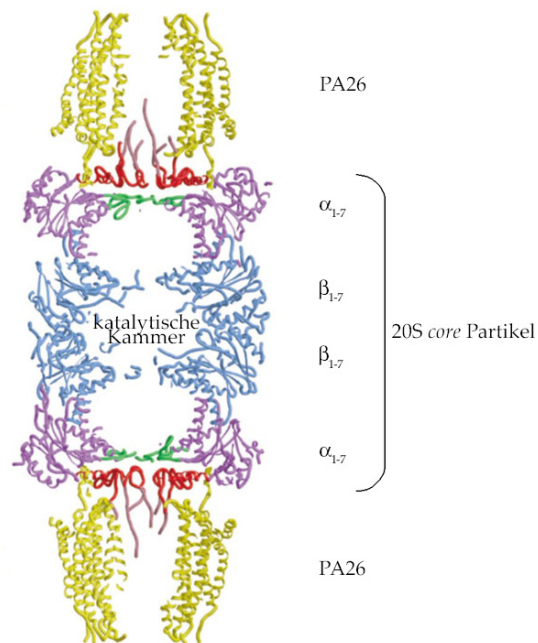


Abb. 1-3. Struktur des PA26-20S-Komplexes. Die C-Termini des PA26 Heptamers aus *T. brucei*, einem Homolog zu PA28 aus Mammalia, interagieren mit den α -Untereinheiten des 20S core Partikels aus *S. cerevisiae*. Die N-Termini der proteasomalen α -Untereinheiten limitieren den Zugang zu den katalytischen Zentren im Inneren. Die Assoziation von PA26 verursacht eine Konformationsänderung und führt zur Öffnung des α -Ringes (modifiziert nach Whitby 2000).

Bei der Untersuchung der Funktion des PA28 Komplexes wurden in PA28 β defizienten Mäusen eine reduzierte Menge an Immunoproteasomen und Beeinträchtigungen in der Immunantwort auf eine Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitisvirus beobachtet. Daraus wurde geschlossen, dass PA28 zur Assemblierung von Immunoproteasomen beiträgt (Preckel 1999). In diesem Fall können die Defekte in der Immunantwort sowohl auf die reduzierte Menge an Immunoproteasomen als auch auf den fehlenden PA28 Komplex zurückzuführen sein. Die spezifische Rolle von PA28 in der Epitopgenerierung kann daher nicht beurteilt werden. Im Gegensatz dazu wurde in PA28 $\alpha\beta$ defizienten Mäusen, die von einer weiteren Arbeitsgruppe generiert wurden, eine normale Immunantwort auf eine Infektion mit dem Influenza A Virus beobachtet, und es wurden, verglichen mit Wildtypmäusen, keine Unterschiede in der Assemblierung von Immunoproteasomen festgestellt. Die Autoren argumentieren, dass möglicherweise die Bildung von PA28 α Homopolymeren in PA28 β defizienten Mäusen zu Beeinträchtigungen in der Assemblierung von Immunoproteasomen führt und so die Unterschiede in der Immunantwort auf virale Infektionen verursacht werden (Murata 2001).

Die Überexpression von PA28 in Fibroblasten unterstützt den Gedanken einer verbesserten Epitopgenerierung, ohne die Assemblierung von Immunoproteasomen zu beeinflussen (Schwarz

2000a). Für einige virale Epitope konnte tatsächlich eine verbesserte Generierung und Präsentation bei der Anwesenheit von PA28 festgestellt werden (Groettrup 1996; van Hall 2000; Schwarz 2000a). Die Funktion von PA28 ist dabei unabhängig von der Inkorporation der Immununtereinheiten in den 20S *core* Partikel (van Hall 2000). Ursächlich scheinen vielmehr Konformationsänderungen des 20S *core* Partikels zu sein. Diese werden durch die Assoziation des PA28 Komplexes an den α -Ring des 20S Proteasoms ausgelöst, ermöglichen eine Substratbindung mit höherer Affinität und eine Verbesserung von Substrateintritt und Produktfreisetzung (Stohwasser 2000). Die Qualität der generierten Peptide scheint dabei nicht beeinflusst. Es kam vielmehr zu einer quantitativen Verschiebung bei der Nutzung der Schnittstellen (Shimbara 1997). Kinetische Untersuchungen mit synthetischen Polypeptidsubstraten führten zu der *double cleavage* Hypothese: Die Assoziation von PA28 an den 20S *core* Partikel führt zu der Generierung von Produkten, die durch zwei koordinierte Schnitte entstehen. Die Zahl von Peptidfragmenten, die durch einen einzelnen Schnitt entstehen, ist bei Anwesenheit von PA28 reduziert (Dick 1996). Der durch PA28 verbesserte Zugang zu den katalytisch aktiven Untereinheiten und die erhöhte Generierung von Produkten, die durch zwei Schnitte entstehen, scheinen ausreichend, um die verbesserte Generierung von Epitopen oder deren Vorläufern in Anwesenheit von PA28 zu erklären. Dennoch konnte ein Epitop des *tyrosinase-related protein 2* identifiziert werden, dessen Generierung PA28-abhängig ist (TRP₂₃₆₀₋₃₆₈) (Sun 2002). Diese PA28-Abhängigkeit wird vor allem durch die N-terminal flankierende Sequenz determiniert, die C-terminal flankierende Sequenz hat nur einen geringen Einfluss (Textoris-Taube 2007). PA28 scheint also für die Generierung einiger Epitope, nicht aber für die Epitopgenerierung generell, notwendig. Wodurch eine PA28-Abhängigkeit determiniert wird, ist bisher nicht bekannt (Murata 2001).

Neben der Assoziation von 20S Proteasomen mit einem oder zwei 19S Regulatoren oder der Assoziation von 20S Proteasomen mit PA28, ist es möglich, dass diese parallel mit je einem PA28 Komplex und einem 19S Regulator assoziieren und Hybridproteasomen bilden (Hendil 1998). Die *in vitro* analysierte Aktivität von Hybridproteasomen übersteigt nicht die von 20S Proteasomen, die mit zwei 19S Regulatoren assoziiert sind, weder beim Abbau fluorogener Peptidsubstrate noch bei der Degradation denaturierter Proteine (Kopp 2001; Cascio 2002). Bei der durchschnittlichen Produktlänge konnten ebenfalls keine Unterschiede festgestellt werden, aber eine qualitative Veränderung des Produktspektrums wurde beobachtet (Cascio 2002). Es wird daher vermutet, dass Erkennung, Entfaltung und Translokation ubiquitinierten Proteinsubstrate durch den 19S Regulator vermittelt werden, und die Assoziation mit PA28 eine Veränderung der Schnittpräferenz

bewirkt. Das kann zu einer erhöhten Variabilität der generierten Produkte führen (Hendil 1998; Cascio 2002).

Die Inkorporation der Immununtereinheiten in 20S *core* Partikel und die Assoziation verschiedener Regulatoren können das Schnittverhalten von Proteasomen also erheblich beeinflussen. Damit wiederum kann der immunologische Phänotyp einer antigenpräsentierenden Zelle verändert werden.

1.4 Coxsackievirus B3 induzierte Myokarditis

Dilatative Kardiomyopathien gehören zu den Hauptursachen für die Ausbildung einer Herzinsuffizienz. Klinische und epidemiologische Untersuchungen belegen, dass viele Fälle einer dilatativen Kardiomyopathie auf eine Myokarditis zurückzuführen sind. Diese wird als inflammatorische Erkrankung des Myokards definiert (Kawai 1999). In Nordamerika und Europa gehören virale Infektionen zu den primären Ursachen. Ein Teil ist auf eine Infektion mit Coxsackievirus B3 (CVB3) zurückzuführen (Feldman 2000).

Coxsackieviren sind nicht-umhüllte Enteroviren der Familie der *Picornaviridae*. Ein einzelsträngiges (+)-RNA-Molekül bildet das Genom mit einer Größe von 7,4kb und codiert für einen offenen Leserahmen. CVB3 Partikel binden im Wirtsorganismus an die Rezeptoren *decay accelerating factor* (DAF; CD55) und *coxsackievirus adenovirus receptor* (CAR). Nach Internalisierung der Viruspartikel erfolgt die *cap*-unabhängige Translation in ein Polyprotein. Die Prozessierung des Polyproteins erfolgt co- und posttranslational in die Vorläuferproteine P1, P2 und P3 durch die viruscodierten Proteasen 2A^{pro} und 3C^{pro}. Aus dem Protein P1 entstehen die Strukturproteine des Capsids, VP1, VP2, VP3 und VP4; P2 und P3 enthalten Nichtstrukturproteine (Abb. 1-4). Durch Replikation entstandene (-)-RNA-Moleküle werden in (+)-RNA-Moleküle umgeschrieben, in das Capsid verpackt und freigesetzt (Esfandiari 2008). Die virusvermittelte Schädigung des Myokards ist auf die zytolytische Wirkung von CVB3 zurückzuführen, aber auch die Prozessierung von Dystrophin durch die CVB3-Protease 2A^{pro} kann dazu beitragen (Badorff 1999).

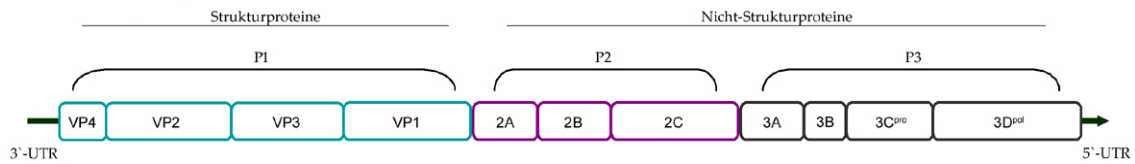


Abb. 1-4. Struktur des CVB3 Polyproteins. Das Polyprotein wird in die Vorläuferproteine P1, P2 und P3 prozessiert. P1 beinhaltet die Strukturproteine, die das Capsid bilden. P2 und P3 beinhalten unter anderem Proteasen und die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Die Proteine VP1 bis VP4 bilden das Capsid, die Protease 2A vermittelt die Hydrolyse von zellulärem Dystrophin. Das Protein 2B erhöht die Permeabilität der Plasmamembran, um eine effiziente Freisetzung der Viruspartikel zu erreichen, und ist gemeinsam mit dem Protein 3A an der Inhibition der zellulären Sekretion beteiligt. Die Protease 3C vermittelt die Prozessierung zellulärer Transkriptionsfaktoren, die RNA-abhängige RNA-Polymerase die Replikation der viralen RNA. Das Protein VPg (3B) bindet an die nichttranslatierte Region (UTR) am 3'-Ende und ist für den Start der Translation notwendig (modifiziert nach Whitton 2005).

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Ubiquitin-Proteasom-System für eine erfolgreiche Virusreplikation notwendig ist. Proteasomeninhibition führte zu einer reduzierten Replikation von CVB3, was einen geringeren Virustiter zur Folge hatte (Luo 2003a). Ferner führt eine Infektion mit CVB3 zu einer ubiquitinabhängigen Degradation von Cyclin D1, was in einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase resultiert (Luo 2003b). Während dieser Phase des Zellzyklus sind die CVB3 Proteinsynthese und die Virusproduktion höher als in der G₂/M Phase (Feuer 2002). Ferner scheint Ubiquitin eine regulatorische Funktion in der CVB3 Infektion zu haben. Für die Replikation der viralen RNA ist die Monoubiquitinierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase notwendig (Si 2008).

1.5 Die experimentelle Myokarditis

Experimentelle Tiermodelle, insbesondere Mausmodelle, tragen zum Verständnis krankheitsbedingter Mechanismen bei. Die kurze Generationszeit von Mäusen und die Etablierung transgener Stämme ermöglichen die Untersuchung und Aufklärung pathogener Mechanismen verschiedener Erkrankungen. Inflammatorische Kardiomyopathien können in Mäusen durch Infektion mit kardiotropen Viren ausgelöst werden. Der Verlauf der experimentellen viralen Myokarditis wird wesentlich durch den genetischen Hintergrund bestimmt (Chow 1992), und lässt sich in drei Phasen unterteilen: Die akute, die subakute und die chronische Phase (Kawai 1999). In der akuten Phase der Infektion kommt es zur Virusreplikation und zur ersten Ausschüttung von Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und IFN- γ (Seko 1997). In Kardiomyozyten lässt sich in diesem Stadium CVB3-RNA nicht nachweisen. In der darauffolgenden subakuten Phase, 4 bis 14 Tage nach Infektion, lässt sich CVB3-RNA auch in Kardiomyozyten nachweisen, und es kommt zur Infiltration von lymphozytären Zellen in das Herz (Klingel 2003; Pummerer

1991). Kennzeichnend ist eine virus- und immunvermittelte Schädigung des Myokards. Resistente Stämme, wie zum Beispiel C57BL/6 Mäuse, eliminieren gegen Ende dieser Phase das Virus (Klingel 2003). In anfälligen Mausstämmen, wie A.BY/SnJ Mäusen, erfolgt keine vollständige Elimination (Klingel 1992). 15 bis 90 Tage nach Infektion spricht man von der chronischen Phase. Virale RNA und das Capsidprotein VP1 können im Herz nachgewiesen werden (Li 2000). Für dieses Stadium ist fibrotisches Gewebe charakteristisch, und die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie kann die Folge sein (Kawai 1999).

Untersuchungen mit verschiedenen *knock out* Mäusen haben gezeigt, dass bei der Kontrolle einer CVB3 Infektion sowohl die Mechanismen der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort von Bedeutung sind. Die Expression von Typ I IFN ist eine der ersten Antworten auf eine Virusinfektion (Pichlmair 2007). Mäuse, die entweder für IFN- β selbst oder für den Rezeptor defizient sind, haben eine geringere Überlebensrate als Wildtypiere (Deonarain 2004; Wessely 2001). Aber auch die CVB3 spezifische zellvermittelte adaptive Immunantwort ist essentiell für die Elimination virusinfizierter Zellen. Dabei sind CD8⁺ T Effektorzellen sowohl an der Kontrolle der CVB3 Infektion beteiligt als auch an der Schädigung des Myokards. Die geringere Überlebensrate CD8⁺ defizienter Mäuse verglichen mit der von Wildtypieren belegt die Bedeutung CD8⁺ T Zellen für die Elimination CVB3 infizierter Zellen (Opavsky 1999). Durch die Depletion von CD8⁺ T Zellen in CD4⁺ defizienten Mäusen wurde eine Abschwächung der Myokarditis erreicht und damit eine Reduktion der Myokardschädigung, gleichzeitig konnte eine höhere Viruslast nachgewiesen werden (Henke 1995). Einen weiteren Hinweis auf die Rolle von CD8⁺ T Zellen in der Elimination CVB3 infizierter Kardiomyozyten erhielt man durch Untersuchungen mit β_2 Mikroglobulin defizienten Mäusen. Diese zeigten den für permissive Tiere charakteristischen Verlauf einer CVB3 Infektion. Neben der fehlenden Viruselimination ist die IFN- γ -Produktion verzögert (Klingel 2003). Eine solche Verzögerung in der IFN- γ -Produktion zeigen auch A.BY/SnJ Mäuse, die eine chronische Myokarditis entwickeln. Damit scheinen CD8⁺ T Effektorzellen die Eingrenzung der CVB3 Infektion durch die Sekretion von IFN- γ zu vermitteln (Klingel 2003; Szalay 2006b). In der Tat haben Perforin- und Fas-vermittelte Effektormechanismen einen geringen Einfluss auf die Eingrenzung der CVB3 Infektion (Gebhard 1998; Huber 2002). Vermutet wird, dass die persistierende Virusinfektion die Entzündung des Herzmuskels aufrecht erhält (Klingel 1992).

Trotz der umfangreichen Untersuchungen zur Rolle von CD8⁺ T Zellen bei der Kontrolle der CVB3 Infektion ist über die Generierung coxsackieviraler MHC Klasse I restringierter Epitope bisher nichts bekannt. Es ist zu vermuten, dass MHC Klasse I präsentierte Epitope oder deren Vorläufer proteasomal generiert werden. Epitope waren zu Beginn der Arbeit nicht identifiziert.

1.6 Zielsetzung

In der CVB3 induzierten Myokarditis trägt die durch CD8⁺ T Zellen vermittelte Immunantwort maßgeblich zur Elimination virusinfizierter Zellen bei. Eine fehlende vollständige Elimination infizierter Zellen kann zu der Entwicklung einer chronischen Myokarditis beitragen, und in einer unzureichenden CD8⁺ T zellvermittelten Immunantwort begründet sein. Bei der Aktivierung von CD8⁺ T Zellen spielt die Präsentation antigener Epitope eine wesentliche Rolle. MHC Klasse I restringierte Epitope sind vorwiegend das Produkt der proteasomenvermittelten Degradation zytosolischer Proteine.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Antigenprozessierung während einer CVB3 induzierten akuten und chronischen Myokarditis untersucht, und die Anpassung des Ubiquitin-Proteasom-Systems an die proinflammatorischen Bedingungen mit Hilfe eines Tiermodells analysiert. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Die Zusammensetzung von 20S Proteasomen aus Herzen und Milzen von C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer CVB3 Infektion analysiert. Insbesondere wurde die Expression der Immununtereinheiten und von PA28 α und PA28 β untersucht.
- Der Einfluss von Typ I und II IFN auf die Zusammensetzung der 20S Proteasomen in den einzelnen Zelltypen des Myokards wurde analysiert.
- Die Epitopgenerierung durch 20S Proteasomen wurde durch *in vitro* Degradation von CVB3 Polypeptiden untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss des Proteasomenaktivators PA28 auf die Generierung von CVB3 Epitopen analysiert.
- Potentiell immunologisch relevante H-2^b-restringierte Epitope sollten identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tab. 2-1. Verwendete Geräte.

ÄKTA FPLC	GE Healthcare
Beckman Optima™ LE-80K	Beckman Coulter
Beckman Avanti J-E	Beckman Coulter
FACSCalibur	BD
Harvester Filtermate 196	Packard Bioscience
Massenspektrometer TSQ7000	Thermo Finnigan Mat
Rotor SW40	Beckman Coulter
Rotor JA-25.50	Beckman Coulter
Rotor JA-14	Beckman Coulter
Synergy™ HT Microplate Reader	BioTek
Szintillationszähler	Packard Bioscience
Ultrafiltrationszelle	Amicon

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Laborchemikalien wiesen einen Reinheitsgrad von $\geq 99\%$ auf und wurden, soweit nicht anders angegeben, bei VWR International, AppliChem oder Roth erworben. Medien für die Zellkultur und FCS wurden von der Biochrom AG, Claycomb Medium bei Sigma Aldrich und Antibiotika für die Zellkultur bei PAA gekauft. Verbrauchsmaterialien wurden von Greiner bezogen. Alle weiteren Chemikalien und Materialien sind in Tab. 2-2 angegeben.

Tab. 2-2. Verwendete Materialien.

Affi-Gel Blue	Biorad
Ampicillin	Roth
β 2 Mikroglobulin	Calbiochem
Bestatin	Roche
NativPAGE™ Novex® 3-12% Bis-Tris-Gele	Invitrogen
Brefeldin A	Serva
Complete®	Roche
Enterotoxin B, <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich
Epoxomicin	Calbiochem
Fibronektin	Sigma-Aldrich
Glutathion-Sepharose	GE Healthcare
Hi Trap Q XL	GE Healthcare
μ RP C18 SC	GE Healthcare
Maus-IFN- β (rekombinant)	Calbiochem
Maus-IFN- γ (rekombinant)	Roche
MG132	VWR
MonoQ HR5/5	GE Healthcare
Norepinephrinbitartrat	Sigma-Aldrich
Pepstatin	Roche
poly (I:C)	Sigma-Aldrich
Phenylsepharose	GE Healthcare
PMA / Ionomycin	Sigma-Aldrich
Protein A Sepharose	GE Healthcare
RotiBlock®	Roth
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	Invitrogen
Streptavidin Agarose	Novagen
Suc-LLVY-AMC	Bachem
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare
Thrombin (biotinyliert)	Novagen
Z-GGL-AMC	Bachem

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

PBS: 8,1mM Na₂HPO₄ / 1,5mM KH₂PO₄ / 0,137M NaCl / 2,7mM KCl

Kalzium- und Magnesium-freies Medium: PBS / 1,7mM Na₂-EDTA / 0,5% (w/v) Phenolrot

Tab. 2-3. Verwendete murine und humane Zelllinien.

Bezeichnung	Zelltyp	Organismus	Kultur	Herkunft
C4	Fibroblasten	murin	adhärent	U. Koszinowski
HL-1	Kardiomyozyten	murin	adhärent	W. Claycomb (Claycomb 1998)
MEC29 PA28	<i>mouse embryonic cell</i> mPA28α ⁺ mPA28β ⁺	murin	adhärent	A. Sijts (van Hall 2000)
Raw264.7	Makrophagen	murin	adhärent	ATCC (TIB-71) (Raschke 1978)
RMA-S	T-Zelllymphoma, TAP ⁻	murin	Suspension	S. Stevanovic (Ljunggren 1989)
T2	T-B-Lymphoblasthybrid MHCII ^{-/-}	human	Suspension	ATCC (CRL-1992) (Salter 1985)
T2.27mp	T2 iβ1 ⁺ iβ2 ⁺ iβ5 ⁺	human	Suspension	U. Kuckelkorn (Groettrup 1997)

Tab. 2-4. Verwendete Medien für die Kultivierung humaner und muriner Zelllinien.

Medium	Zusätze
basal Iscove Medium	10% FCS / 2mM L-Glutamin / 100U/ml Penicillin / 0,1mg/ml Streptomycin
Claycomb Medium	10% FCS / 2mM L-Glutamin / 100U/ml Penicillin / 0,1mg/ml Streptomycin / 0,1mM Norepinephrin
RPMI 1640 Medium	10% FCS / 2mM L-Glutamin / 100U/ml Penicillin / 0,1mg/ml Streptomycin

Tab. 2-3. Verwendete murine und humane Zelllinien.

Bezeichnung	Zelltyp	Organismus	Kultur	Herkunft
C4	Fibroblasten	murin	adhärent	U. Koszinowski
HL-1	Kardiomyozyten	murin	adhärent	W. Claycomb (Claycomb 1998)
MEC29 PA28	<i>mouse embryonic cell</i> mPA28 α^+ mPA28 β^+	murin	adhärent	A. Sijts (van Hall 2000)
Raw264.7	Makrophagen	murin	adhärent	ATCC (TIB-71) (Raschke 1978)
RMA-S	T-Zelllymphoma, TAP-	murin	Suspension	S. Stevanovic (Ljunggren 1989)
T2	T-B-Lymphoblasthybrid MHCII ^{-/-}	human	Suspension	ATCC (CRL-1992) (Salter 1985)
T2.27mp	T2 i β 1+ i β 2+ i β 5+	human	Suspension	U. Kuckelkorn (Groettrup 1997)

Die Kultur von Zellen murinen und humanen Ursprungs (Tab. 2-3) erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Adhärenz wachsende Zellen wurden in sterilen Zellkulturschalen in vollsupplementiertem basal Iscove Medium kultiviert (Tab. 2-4). 90% konfluente Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen, mit Kalzium- und Magnesium-freiem Medium abgelöst, 5min bei 4°C und 200x g zentrifugiert und in einer Dichte von 1 bis 2x10⁵ Zellen/ml für die weitere Kultivierung ausgesät.

Suspensionszellen wurden in RPMI Medium in sterilen Zellkulturflaschen kultiviert. Sie wurden bei einer Dichte von 1x10⁶ Zellen/ml bei 4°C und 200x g 5min zentrifugiert und in einer Dichte von 1 bis 2x10⁵ Zellen/ml ausgesät.

Wurden Zelllinien murinen Ursprungs verwendet, so wurde den Medien außerdem 50 μ M β -Mercaptoethanol zugesetzt. T2.27mp Zellen wurden unter 1mg/ml G418, MEC29 PA28 Zellen mit 200 μ g/ml Hygromycin, 5 μ g/ml Puromycin und 0,6 μ g/ml Doxycyclin kultiviert.

Besonderheiten in der Kultur von HL-1 Zellen

Beschichten der Kulturflaschen: 5µg/ml Fibronectin / 0,02% (w/v) Gelatine

Claycomb Waschmedium: 5% (v/v) FCS / 100U/ml Penicillin / 0,1mg/ml Streptomycin

Kulturflaschen wurden für mindestens 8 und höchstens 12h mit 0,4µg/cm² Fibronectin bei 37°C und 5% CO₂ beschichtet. Bei 90 bis 95% Konfluenz wurden die HL-1 Zellen mit vorgewärmtem Trypsin-EDTA gewaschen und 5min bei 37°C und 5% CO₂ mit Trypsin-EDTA inkubiert. Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (0,25mg/ml) wurde im Verhältnis 1:1 (v/v) dazugegeben. Nach Zugabe von Claycomb Waschmedium wurden die Zellen 5min bei 4°C und 500x g zentrifugiert. Vor Aussaat der Zellen für die weitere Kultivierung wurde die Fibronectin-Gelatine-Lösung aus den Kulturflaschen entfernt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1x10⁵/ml in Claycomb Medium ausgesät. Das Medium wurde täglich gewechselt.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen

Einfriermedium: 20% (v/v) FCS / 10% (v/v) DMSO in basal Iscove oder RPMI Medium

Einfriermedium HL-1 Zellen: 95% (v/v) FCS / 5% DMSO

1x10⁶ Zellen wurden in 1ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. In einer vorgekühlten Isopropanol-Einfrierbox wurden die Zellen zunächst bei -80°C bei einer Kühlungsrate von 1°C/min eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei -196°C langfristig gelagert.

Eingefrorene Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 10ml auf 37°C temperiertes Medium überführt, zentrifugiert (5min, 4°C, 200x g), mit Medium gewaschen und in einer Dichte von 1 bis 2x10⁵ Zellen/ml ausgesät. Nach 4h oder Adhärenz der Zellen wurde das Medium nochmals gewechselt.

2.4 Mausmodell

C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse wurden gemäß den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes im Tierstall der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, und in der Abteilung für Molekulare Pathologie Tübingen gehalten. Weibliche und männliche Tiere wurden im Alter von 6 Wochen mit 1×10^5 *plaque forming units* (PFU) CVB3 (Nancy / Swiss-Prot entry name: POLG_CXB3N; Swiss-Prot entry: P03313) intraperitoneal infiziert. Tötung und Organentnahme erfolgte an den Tagen 4 und 8 nach Infektion und von nicht-infizierten Tieren.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Herstellen von Zell- und Gewebelysaten

Gesamtlysate aus Zelllinien

TSDG-Puffer: 10mM Tris/HCl pH7,0 / 25mM KCl / 10mM NaCl / 1,1mM MgCl₂ / 0,1mM Na₂-EDTA / 10% Glycerin

1×10^6 HL-1, C4 oder Raw264.7 Zellen wurden durch Zentrifugation (5min, 4°C, 200x g) pelletiert, mit PBS gewaschen und in 100 bis 200µl TSDG-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden durch drei Frier-Tau-Zyklen (Einfrieren in flüssigem Stickstoff, Auftauen bei 25°C) lysiert, Zelltrümmer durch Zentrifugation (20min, 4°C, 14000x g) entfernt.

Gesamtlysate aus Organen

Lysepuffer: 20mM Tris/HCl pH7,2 / 1mM DTT / 5mM MgCl₂ / 0,5% (v/v) Nonidet P-40 / Complete® / 1µM Pepstatin / 2µg/ml Bestatin

Je ein Herz oder eine Milz wurde in maximal 500µl Lysepuffer aufgenommen und mit einem Turrax® zerkleinert. Das Homogenat wurde 10min auf Eis inkubiert, es folgten drei Frier-Tau-Zyklen. Die löslichen Proteine wurden durch Zentrifugation (15min, 4°C, 14000x g) von den Zelltrümmern getrennt.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) nach Herstellerangaben im Mikrotiterplattenformat bestimmt.

2.5.3 Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli

Sammelgel: 5% Acrylamid / 125mM Tris/HCl pH6,8 / 0,1% (w/v) SDS / 0,05% (w/v) APS / 0,03% (v/v) TEMED

Trenngel: 10-15% Acrylamid / 375mM Tris/HCl pH8,8 / 0,1% (w/v) SDS / 0,05% (w/v) APS / 0,03% (v/v) TEMED

SDS-Probenpuffer: 50mM Tris/HCl pH6,8 / 1,6% (w/v) SDS / 4% Glycerin / 1,6% (v/v) β -Mercaptoethanol / 0,02mg/ml (w/v) Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer: 19,2mM Glycin / 2,5mM Tris/HCl / 0,1% (w/v) SDS

1 bis 2 μ g gereinigte Proteine oder 12,5 bis 25,0 μ g Gesamtproteinextrakt aus Zellen oder Organen wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5min bei 95°C denaturiert und auf SDS-Polyacrylamidgele geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80V bis die Proteine in das Trenngel eingelaufen waren, anschließend konstant bei 100V. In Abhängigkeit von der Fragestellung wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blau R250 oder Silbernitrat gefärbt, oder die Proteine auf eine PVDF-Membran mittels *semi dry* Elektroblob übertragen.

Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schagger & Jagow

Sammelgel: 6% Acrylamid / 0,744M Tris/HCl pH8,45 / 0,1% SDS / 0,05% APS / 0,05% TEMED

Trenngel: 16% Acrylamid / 1M Tris/HCl pH8,45 / 13% (w/v) Glycerol / 0,1% (w/v) SDS / 0,05% (w/v) APS / 0,03% (v/v) TEMED

Anodenpuffer: 0,2M Tris/HCl pH8,9

Kathodenpuffer: 0,1M Tris/HCl / 0,1M Tricin / 0,1% (w/v) SDS

Die Präzipitate einer Immunpräzipitation oder 12,5 bis 25 μ g Gesamtproteinextrakt aus Zelllinien oder Organen wurden auf die Polyacrylamidgele geladen. Die Elektrophorese erfolgte 1h bei 30V, danach 16 bis 20h für 85V. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran mittels *semi dry* Elektroblob übertragen.

2.5.4 Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Probenpuffer: 10% (v/v) Glycerol / 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Laufpuffer: 2,5mM Tris/HCl / 19,2mM Glycin

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurden Gele mit Polyacrylamidgradienten von 3 bis 12% (Tab. 2-2) verwendet. Je 4,0µg gereinigte 20S Proteasomen wurden mit Probenpuffer versetzt und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C für 1h bei 40V und anschließend für 12h bei 90V.

2.5.5 Western Blot und Proteindetektion

Anodenpuffer I: 300mM Tris/HCl / 20% (v/v) Methanol

Anodenpuffer II: 25mM Tris/HCl / 20% (v/v) Methanol

Kathodenpuffer: 40mM ε-Aminocapronsäure / 20% (v/v) Methanol

Der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem bei 400mA für 1h im *semi dry* Elektroblobverfahren. Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen, wurden die Membranen für 15min mit Coomassie Brilliant Blau R250 gefärbt, mit 50% Methanol entfärbt und dokumentiert. Nach vollständiger Entfärbung mit 100% Methanol wurden die Membranen für 1h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit RotiBlock® blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tab. 2-5) erfolgte über Nacht bei 4°C. Auf dreimaliges Waschen für 15min mit PBS / 0,15% Tween20 folgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 bis 4h bei Raumtemperatur (Tab. 2-5). Die Membran wurde dreimal für 15min mit PBS / 0,15% Tween20 gewaschen und abschließend mit PBS gespült. Die Detektion erfolgte über eine peroxidasevermittelte Chemoluminiszenzreaktion (ECL Detektionsreagenz).

Tab. 2-5. Für die Proteindetektion verwendete Antikörper in Western Blot Analysen.

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Quelle
K378/1	$\alpha 4$	Kaninchen anti Maus	AG Kloetzel
K379	$\alpha 6$	Kaninchen anti Maus	AG Kloetzel
69699	i β 1	Kaninchen anti Maus	AG Kloetzel
K65/4	i β 2	Kaninchen anti Maus	AG Kloetzel
K63/5	i β 5	Kaninchen anti Maus	AG Kloetzel
K232/1	PA28 α	Kaninchen anti Maus	AG Kloetzel
K231/2	PA28 β	Kaninchen anti Maus	AG Kloetzel
Sc-25778	GAPDH (FL-335)	Kaninchen anti human	Santa Cruz
111-035-003	IgG	Ziege anti Kaninchen	Dianova

2.5.6 Immunpräzipitation

Saccharosepuffer: 0,25M Saccharose / 0,025M Hepes/KOH pH7,2 / 10mM MgCl₂

TSDG-Puffer: 10mM Tris/HCl pH7,0 / 25mM KCl / 10mM NaCl / 1,1mM MgCl₂ / 0,1mM Na₂-EDTA / 10% Glycerin

Lysepuffer: 20mM Tris/HCl pH7,2 / 1mM DTT / 5mM MgCl₂ / 0,5% (v/v) Nonidet P-40 / Complete® / 1 μ M Pepstatin A / 2 μ g/ml Bestatin

Je 100 μ g Gesamtproteinextrakt aus HL-1, C4 oder Raw264.7 Zellen wurden für die Präzipitation von 20S Proteasomen in 1,0ml TSDG-Puffer aufgenommen und 5min bei 4°C mit 0,1mg/ml BSA inkubiert. 2,0 μ l Antikörper (Tab. 2-6) wurden hinzugegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. In TSDG-Puffer äquilibrierte Protein-A-Sepharose wurde 2h mit 20 μ g/ml BSA inkubiert und je 20 μ l Bettvolumen Protein-A-Sepharose wurden zu dem Präzipitationsansatz gegeben und weitere 4h bei 4°C rotierend inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde 2min bei 4°C und 2000x g zentrifugiert, fünfmal mit Saccharosepuffer und einmal mit A. dest gewaschen. Die Protein-A-Sepharose wurde in 35 μ l zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Bei der Präzipitation von 20S Proteasomen aus Organhomogenaten wurden 100 μ g Gesamtproteinextrakt in 1,0ml Lysepuffer aufgenommen. Die Durchführung erfolgte analog zu der aus Zellen. Die Protein-A-Sepharose wurde dreimal mit PBS, zweimal mit A. dest gewaschen und in 35 μ l zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Tab. 2-6. Verwendete Antikörper für Immunpräzipitationen von 20S Proteasomen.

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Quelle
K08	20S	Kaninchen anti Maus	AG Kloetzel
Mcp444	β 7	Maus anti human	Biomol

2.5.7 Bestimmung der proteolytischen Aktivität von 20S Proteasomen

TEAD: 20mM Tris/HCl pH 7,2 / 1mM Na₂-EDTA / 1mM Na-Azid / 1mM DTT

Assaypuffer: 20 bis 100 μ M Suc-LLVY-AMC oder Z-GGL-AMC / TEAD

Die enzymatische Aktivität von Proteasomen wurde mit kleinen fluorogenen Peptiden bestimmt. 100 μ l Assaypuffer wurden mit 0,4 bis 1 μ g/ml 20S Proteasomen 30 bis 60min bei 37°C inkubiert. Die Menge des freigesetzten Fluorophors 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) wurde in einem Synergy™ HT *microplate reader* bestimmt. Freies AMC wird bei einer Wellenlänge von 360nm angeregt und emittiert bei einer Wellenlänge von 460nm.

Zur Bestimmung der PA28 Aktivität wurden 5 bis 10 μ l PA28-haltiger Fraktionen mit 40 oder 100ng 20S Proteasomen in 100 μ l Assaypuffer inkubiert. Wurde rekombinantes PA28 eingesetzt, wurden 20 bis 125ng rekombinantes PA28 mit 40 oder 100ng 20S Proteasomen in 100 μ l Assaypuffer für 1h bei 37°C inkubiert. Reaktionsansätze ohne PA28 dienten als Kontrolle für die proteasomale Aktivität. Die Messung der freigesetzten Menge an AMC erfolgte analog dem Proteasomenassay.

Für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von 20S Proteasomen im Polyacrylamidgel nach einer Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurden die Gele mit 100 μ M Suc-LLVY-AMC / TEAD überschichtet und 15min bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Anregung mit UV-Licht.

2.5.8 Isolation von 20S Proteasomen

Isolation von 20S Proteasomen aus T2 und T2.27mp Zellen

TEAD: 20mM Tris/HCl pH 7,2 / 1mM Na₂-EDTA / 1mM Na-Azid / 1mM DTT

Lysepuffer: TEAD / 50mM NaCl / Complete®

Assaypuffer: 20µM Z-GGL-AMC / TEAD

2 bis 3×10^9 Zellen wurden in eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und mit einem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wurde 30min auf Eis inkubiert und anschließend 30min bei 4°C und 24000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Volumen in TEAD äquilibriertem DEAE-Sephacel 1h rollend bei 4°C inkubiert. Das DEAE-Sephacel wurde in eine Säule überführt und mit mindestens drei Säulenvolumen 80mM NaCl / TEAD gewaschen bis kein Protein mehr detektiert werden konnte ($\lambda = 280\text{nm} \leq 0,08$). Die Elution erfolgte mit zwei bis drei Säulenvolumen 500mM NaCl / TEAD in 1,5ml Fraktionen. Für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität wurden 10µl jeder Fraktion mit 100µl Assaypuffer 30min bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte im Synergy™ HT *microplate reader*. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt und auf Eis durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat auf eine Sättigung von 35% (194g/l) gebracht und zentrifugiert (20min, 4°C, 18500x g). Der proteasomenhaltige Überstand wurde, ebenfalls auf Eis, auf eine Ammoniumsulfatsättigung von 70% eingestellt (218g/l) und erneut zentrifugiert (30min, 4°C, 18500x g). Das Pellet wurde vorsichtig in eiskaltem TEAD gelöst und auf einen Saccharosegradienten [10 bis 40% (w/v)] geladen. Die Gradienten wurden ultrazentrifugiert ($\omega^2 t \times 10^{12} \text{rad/sec}$) und anschließend zu je 0,6ml fraktioniert. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität erfolgte wie beschrieben (1.5.7). Proteasomenhaltige Fraktionen wurden vereinigt und mit fünf bis zehn Volumen TEAD verdünnt, auf eine MonoQ HR5/5 Säule aufgetragen und in einem linearen Gradienten (200 bis 350mM NaCl / TEAD) über 20 Säulenvolumen eluiert. Die vereinigten aktiven Fraktionen wurden auf sechs Volumen mit TEAD aufgefüllt und auf ein Affi-Gel Blue aufgetragen. Es wurde mit fünf Säulenvolumen 200mM NaCl / TEAD in 1,5ml Fraktionen eluiert, anschließend wurde mit fünf Säulenvolumen 500mM NaCl / TEAD eluiert, ebenfalls in 1,5ml Fraktionen. Die proteolytische Aktivität der nichtgebundenen Proteine, der mit 200mM NaCl / TEAD und 500mM NaCl / TEAD eluierten Proteine wurde wie oben beschrieben bestimmt. Proteasomenhaltige Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert (MW cut off 100000) und in 50mM NaCl / TEAD aufgenommen. Die Konzentration der isolierten 20S Proteasomen wurde im BCA-Test (2.5.2) bestimmt.

Isolation von 20S Proteasomen aus Mausorganen

Lysepuffer: TEAD / 5mM MgCl₂ / 0,5% Nonidet P-40 / 1μM Pepstatin A / 2μg/ml Bestatin / Complete®

C57BL/6 und A.BY/SnJ wurden mit 1x10⁵ PFU CVB3 infiziert. Am Tag vier und acht nach Infektion wurden die Tiere getötet, Herz und Milz entnommen. Als Kontrollen wurden nicht-infizierte Mäuse getötet und ebenfalls Herz und Milz entnommen. Für eine Präparation von 20S Proteasomen wurden je zehn Organe vereinigt. Diese wurden in zehn Volumen eiskaltem Lysepuffer aufgenommen, mit einem Turrax® zerkleinert und mit einem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wurde 30min auf Eis inkubiert und 30min bei 4°C und 24000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals in fünf Volumen Lysepuffer aufgenommen und erneut mit dem Douncer homogenisiert. Nach Zentrifugation (30min, 4°C, 24000x g) wurden beide Überstände vereinigt. Die weitere Reinigung erfolgte analog zu der aus T2 und T2.27mp Zellen.

2.5.9 Isolation von PA28 aus MEC29 PA28 Zellen

TEAD: 20mM Tris/HCl pH 7,2 / 1mM Na₂-EDTA / 1mM Na-Azid / 1mM DTT

Lysepuffer: 250mM Saccharose / TEAD

Assaypuffer: 50μM Suc-LLVY-AMC / TEAD

Die Expression der murinen PA28 Untereinheiten α und β der MEC29 PA28 Transfektanten wird durch einen Tetrazyklin-reprimierbaren Promoter reguliert (Tet-Off System). Für die Präparation von PA28 wurden MEC29 PA28 Zellen in Abwesenheit von Tetrazyklin zwei Tage kultiviert und geerntet (5min, 4°C, 200x g). 2,5x10⁹ MEC29 PA28 Zellen wurden in fünf bis zehn Volumen eiskaltem Lysepuffer aufgenommen und mit einem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wurde für 30min auf Eis inkubiert und anschließend 30min bei 4°C und 24000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 1/5 Volumen in TEAD äquilibriertem DEAE-Sepharcel gegeben, 1h bei 4°C rollend inkubiert und danach in eine Säule überführt. Es wurde mit vier Säulenvolumen 10% Glycerol / TEAD gewaschen, anschließend mit zwei Säulenvolumen 10% Glycerol / 500mM NaCl / TEAD in 1,5ml Fraktionen eluiert. Für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität wurden 10μl jeder Fraktion mit 100μl Assaypuffer bei 37°C für 1h inkubiert und freies AMC in einem Synergy™ HT *microplate reader* bestimmt. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und in einer Ultrafiltrationszelle (Membran YM-100) auf ein Endvolumen von 5ml eingengt. Glycerolgradienten [15 bis 45% (w/v)] wurden mit dem Konzentrat überschichtet und ultrazentrifugiert ($\omega^2 t \times 10^{12} \text{rad/sec}$). Die Gradienten wurden zu je 0,6ml fraktioniert. Für die

Bestimmung der PA28-haltigen Fraktionen wurden 10µl jeder Fraktion mit 0,4µg/ml oder ohne 20S Proteasomen mit 100µl Assaypuffer für 1h bei 37°C inkubiert. Freigesetztes AMC wurde bei 360nm in einem Synergy™ HT *microplate reader* angeregt, die Emission bei 460nm gemessen. Die 20S Proteasomen aktivierenden Fraktionen wurden vereinigt. Die Probe wurde mit zwei Volumen 10% Glycerol / 50mM NaCl / TEAD verdünnt, auf eine MonoQ HR5/5 Säule geladen und in einem linearen Gradienten (50 bis 250mM NaCl / 10% (v/v) Glycerol / TEAD) mit 26 Säulenvolumen eluiert. Aktivierende Fraktionen wurden wiederum vereinigt, auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 1M eingestellt und auf eine Phenylsepharosesäule aufgetragen. Die Elution erfolgte linear (1 bis 0M Ammoniumsulfat / TEAD) in 25 Säulenvolumen. Die Bestimmung der PA28 Aktivität erfolgte wie beschrieben. Die PA28-haltigen Fraktionen wurden einzeln auf Eis aufbewahrt.

2.5.10 *in vitro* Degradation von synthetischen Polypeptiden

Verdaupuffer: 20mM Hepes/KOH pH 7,8 / 2mM Mg-Acetat / 2mM DTT

Alle verwendeten Polypeptide wurden in der Arbeitsgruppe Dr. Henklein (Charité Universitätsmedizin Berlin, Institut für Biochemie) synthetisiert. Die Synthese erfolgte durch einen Applied Biosystems 433A automatisierten Synthesizer (Norwalk, CT), die Reinigung mittels *reversed phase* HPLC. Der Reinheitsgrad wurde mittels MALDI-TOF ($\geq 90\%$) bestimmt. Die Peptide wurden in 10% DMSO in einer Konzentration von 1mg/ml gelöst (Tab. 2-7).

Für die Untersuchung proteasomenvermittelter Degradationen wurden 3,0µg Polypeptid mit 1,0µg gereinigten 20S Proteasomen (Tab. 2-7, Nr. 1 bis 4), oder 3,8µg Peptid mit 1,9µg 20S Proteasomen (Tab. 2-7, Nr. 5 und 6) in 100µl Verdaupuffer bei 37°C über einen Zeitraum von 0 bis 24h inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Trifluoressigsäure in einer Endkonzentration von 0,3% gestoppt, die Proben anschließend bei -20°C eingefroren. Für Inhibitionsexperimente wurden 20S Proteasomen 30min mit 50µM MG132 auf Eis vorinkubiert, anschließend erfolgte die Substratzugabe. Um den Einfluss von PA28 auf das Schnittverhalten und die Substratumsatzrate durch 20S Proteasomen zu untersuchen, wurde rekombinantes PA28 in einem sechsfachen molaren Überschuss eingesetzt. Wurde isoliertes PA28 aus MEC29 PA28 Zellen verwendet, so wurde von den PA28-haltigen Fraktionen das Volumen eingesetzt, das für eine maximale Aktivierung der 20S Proteasomen mindestens notwendig war. Alle *in vitro* Degradationsexperimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Tab. 2-7. Verwendete synthetische Polypeptidpeptide für *in vitro* Degradationsexperimente mit 20S Proteasomen. Die Bezeichnung, die Aminosäuresequenz und die Position (AS = Aminosäure) im CVB3 Polyprotein sind angegeben. Rot gedruckt sind die Sequenzen, die potentielle H-2D^b- oder H-2K^b-restringierte Epitope darstellen. *Die Bezeichnung der Polypeptide leitet sich von der Lage im CVB3 Polyprotein ab: VP2 = Hüllprotein, P2C = Protein 2C, Pol = RNA-abhängige RNA-Polymerase, 3C = Picornain 3C.

Nummer	Bezeichnung*	Aminosäuresequenz	Position
1	CVB3 VP2 _[238-263]	QRVYNAGMG VG VGNLT IF PHQWINL	AS 238-263 (V240 deletiert)
2	CVB3 VP2 _[272-302]	VMPYTNSVPMDNMFRHNNVTLMVIPFVPLDY	AS 272-302
3	CVB3 P2C _[1161-1190]	ATIEQSAPSQSDQE QLFSNVQYF AHYCRKY	AS 1161-1190
4	CVB3 Pol _[1892-1917]	AKGKSRLIE ASSLND SVAM RQTFGNL	AS 1892-1917
5	CVB3 3C _[1549-1576]	AMMKRNSSRVK TEYGEFTML GIYDRWAV	AS 1549-1576
6	CVB3 Pol _[2158-2185]	RKIRSVPGRC LTLPAFSTL RRKWLDSE	AS 2158-2185

30µl des Reaktionsansatzes aus den *in vitro* Degradationsexperimenten wurden mit 20µl 0,25µM 9GPS (YPHFMPNLTGPS) gemischt und in einer *reversed phase* HPLC über eine µRPC C18 SC 2,1mm Säule separiert. Nach Trennung des Peptidgemisches wurden die Fragmente direkt durch ein Elektrospray ionisiert und in ein Tandemquadrupol Massenspektrometer injiziert. Die Identifizierung der Peptide erfolgte online durch Tandem-Massenspektrometrie-Experimente anhand des Masse / Ladungsverhältnisses. Mit dem Suchalgorithmus SEQUEST des Programms Bioworks wurden die Produkte der *in vitro* Degradationsexperimente bewertet und Schnittkarten erstellt. Weitergehende quantitative Analysen wurden anhand dieser Schnittkarten mit Hilfe des Masse / Ladungsverhältnisses und der Retentionszeit der einzelnen Fragmente mit dem Programm XCalibur durchgeführt. Um gerätebedingte Schwankungen der Intensität auszugleichen, wurden die Intensitäten der eingesetzten Substrate und die Intensitäten der Produkte auf die Intensität des mitgeführten Standards 9GPS normiert.

2.6 Immunologische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Bindungseigenschaften potentieller CVB3 Epitope

MHC Affinitätsassay

FACS-Puffer: PBS / 1% (w/v) BSA / 0,02% (w/v) Na-Azid

Citratpuffer: 0,263M Citrat / 0,123M Na₂HPO₄

4x10⁵ Zellen wurden jeweils in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte ausgesät. Nach Behandlung mit Citratpuffer für 1,5min wurden die Zellen dreimal mit serumfreiem RPMI Medium gewaschen (10min, 4°C, 500x g), anschließend mit Peptidkonzentrationen von 1x10⁻⁹M bis 1,25x10⁻⁴M oder ohne Peptid über Nacht bei 26°C in serumfreiem RPMI Medium, dem 1,5µg/ml β₂ Mikroglobulin zugesetzt wurden, inkubiert (Tab. 2-8). Auf zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer (10min, 4°C, 500x g) folgte die Färbung der H-2D^b und H-2K^b Moleküle für die FACS-Analyse (siehe Färbung von Oberflächenmolekülen für die FACS-Analyse).

Tab. 2-8. Verwendete Peptide für durchflusszytometrische Analysen und im Proliferationstest. Die Bezeichnung, die die Lage im CVB3 Polyprotein wiedergibt, die MHC Restriktion und die Aminosäuresequenz sind angegeben. * Die Peptide OVA_[257-264] und LCMV NP_[396-404] dienten als Bindungskontrollen zur Bestimmung der MHC Affinität und MHC Stabilität für H-2K^b- und H-2D^b-restringierte Epitope. Alle Peptide wurden in der Arbeitsgruppe Dr. Henklein der Charité Berlin synthetisiert.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	Haplotyp	Bemerkung
CVB3 VP2 _[273-281]	MPYTNSVPM	H-2D ^b	
CVB3 VP2 _[285-293]	FRHNNVTLM	H-2D ^b	
CVB3 VP2 _[284-292]	MFRHNNVTL	H-2D ^b	
CVB3 VP2 _[285-292]	FRHNNVTL	H-2D ^b	
CVB3 3C _[1561-1568]	EYGEFTML	H-2K ^b	
CVB3 Pol _[2170-2177]	TLPAFSTL	H-2K ^b	
CVB3 VP2 _[128-135]	ATCRFYTL	H-2K ^b	
OVA _[257-264]	SIINFEKL	H-2K ^b	Huhn Ovalbumin*
LCMV NP _[396-404]	FQPQNGQFI	H-2D ^b	lymphozytäres Choriomeningitisvirus*

MHC Stabilitätsassay

Je 4×10^5 Zellen wurden in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte ausgesät, mit Citratpuffer 1,5min inkubiert, dreimal mit serumfreiem RPMI Medium gewaschen und über Nacht bei 26°C mit 10^{-4} M Peptid (Tab. 2-8) oder ohne Peptid in serumfreiem RPMI Medium mit 1,5µg/ml β_2 Mikroglobulin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit serumfreiem RPMI Medium gewaschen und weitere 0 bis 12h in vollsupplementiertem RPMI Medium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (10min, 4°C, 500x g) und mit FACS-Puffer zweimal gewaschen. Danach wurden die Zellen 20min bei Raumtemperatur mit 1% Paraformaldehyd / PBS fixiert und die MHC Klasse I Moleküle für die FACS-Analyse gefärbt (siehe Färbung von Oberflächenmolekülen für die FACS-Analyse).

Färbung von Oberflächenmolekülen für die FACS-Analyse

Für die Färbung der MHC Klasse I Moleküle wurden die Zellen 1h auf Eis im Dunkeln mit Phycoerythrin-gekoppelten Antikörpern inkubiert, die entweder gegen H-2D^b- oder gegen H-2K^b-Moleküle gerichtet waren (Tab. 2-9). Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 300µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung erfolgte am FACSCalibur, die Auswertung mit der Software CellQuestPro.

Tab. 2-9. Verwendete Antikörper für durchflusszytometrische Analysen. Alle Fluorochrom-gekoppelten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. * FITC = Fluoresceinisothiocyanat; PE = Phycoerythrin.

Spezifität	Fluorochrom*	Klon	Spezies	Isotyp	Herkunft
CD16/CD32		2.4G2	Ratte anti Maus	IgG _{2b}	BD Biosciences
CD8a	FITC	53-6.7	Ratte anti Maus	IgG _{2a}	BD Biosciences
H-2K ^b	PE	AF6-88.5	Maus anti Maus	IgG _{2a}	BD Biosciences
H-2D ^b	PE	KH95	Maus anti Maus	IgG _{2b}	BD Biosciences
IFN- γ	PE	XMG1.2	Ratte anti Maus	IgG ₁	BD Biosciences

Berechnung von Relativer Affinität und Halbwertszeit

Die Berechnung von Relativer Affinität und Halbwertszeit erfolgte in Anlehnung an Tourdot *et al.* (Tourdot 2000). Die MHC Klasse I Affinität ist ein Maß für die Bindungsstärke und kann als Relative Affinität ausgedrückt werden. Dafür wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (*geometric mean fluorescence intensity*) für jede Peptidkonzentration bestimmt und die mittlere Fluoreszenzintensität ohne Peptid substrahiert. Die maximale Stabilisierung von MHC Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche wurde durch 100µM des H-2D^b-restringierten Positivkontrollpeptids LCMV NP_[396-404] erreicht, und durch 125µM des H-2K^b-restringierten Referenzpeptids OVA_[257-264] (Tab. 2-8). Diese Werte wurden jeweils als Maximalbindung definiert. Die Relative Affinität wurde dann durch folgende Berechnung bestimmt: Peptidkonzentration des zu testenden Peptids, die 20% der Maximalbindung entspricht, dividiert durch die Peptidkonzentration des jeweiligen Referenzpeptides, die 20% der Maximalbindung entspricht. Je niedriger der Wert für die Relative Affinität, desto höher die Affinität des zu testenden Peptids.

Die Beurteilung der Stabilität einer Bindung erfolgte durch die Bestimmung der Halbwertszeit der MHC Klasse I-Peptidkomplexe auf der Zelloberfläche. Die mittlere Fluoreszenzintensität ohne Peptid wurde von der mittleren Fluoreszenzintensität für jedes Peptid zu jedem Zeitpunkt substrahiert. Der Dissoziationskomplex DC₅₀ ist definiert als die Zeit, die notwendig ist, um die Hälfte der stabilisierten MHC Klasse I-Peptidkomplexe zum Zeitpunkt 0 zu verlieren. Je höher der Wert [h] für den DC₅₀, desto stabiler die Bindung.

Um die Bindungseigenschaften der eingesetzten Peptide zu bestimmen, wurden alle Experimente zur MHC Affinität und MHC Stabilität mindestens dreimal in Dreifachansätzen durchgeführt.

2.6.2 Analyse antigenspezifischer T Zellantworten

Präparation von Milzzellen

hypotoner Puffer: 0,01M KHCO₃ / 0,15M NH₄Cl / 0,1M Na₂-EDTA pH7,5

8 Tage nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 1x10⁵ PFU CVB3 wurden die Tiere getötet und die Milzen entnommen. Als Kontrolle wurden naive Tiere getötet und die Milzen entnommen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Milz mit einem Spritzenstempel durch ein 70µm Sieb gerieben und das Sieb anschließend mit PBS gespült. Nach Zentrifugation (6min, 4°C, 350x g) wurde das Homogenat in fünf Volumen hypotonem Puffer aufgenommen und 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zwei Volumen vollsupplementiertes RPMI Medium zugegeben. Die Zellen wurden zentrifugiert (6min, 4°C, 350x g), zweimal mit PBS gewaschen und in RPMI Medium aufgenommen. Die Einzelzellsuspensionen der Milzen wurden entweder für einen Proliferationstest oder für die Analyse antigenspezifischer T Zellantworten durch intrazelluläre Zytokinfärbung verwendet.

Für einen Proliferationstest wurden CD8a⁺ T Zellen aus diesen Einzelzellsuspensionen magnetisch durch negative Selektion separiert. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (CD8a⁺ T Zell Isolation Kit Mouse / Miltenyi Biotec) und soll hier nur kurz dargestellt werden: 1 bis 2x10⁸ Zellen der Milzzellsuspensionen wurden mit einem Gemisch Biotin-gekoppelter Antikörper inkubiert, die spezifisch waren gegen Oberflächenmoleküle von nicht-CD8a⁺ Zellen. Nach Zugabe von anti-Biotin-Antikörpern, die an *MicroBeads* konjugiert waren, erfolgte die magnetische Separation.

Proliferationstest

Tab. 2-10. In Proliferationstests eingesetzte Peptidgemische.

Nummer	enthaltene Peptide	Peptidkonzentration [µg/ml]
1	CVB3 VP2 _[285-293] / CVB3 VP2 _[284-292] / CVB3 VP2 _[273-281]	je Peptid 5 oder 25
2	CVB3 VP2 _[128-135] / CVB3 Pol _[2170-2177] / CVB3 3C _[1561-1568]	je Peptid 5 oder 25

2x10⁵ Zellen einer Einzelzellsuspension aus Milzen oder CD8a⁺ T Zellen nach Separation wurden jeweils in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte ausgesät und mit 5µg/ml oder 25µg/ml Peptid oder

ohne Peptid für insgesamt 72h bei 37°C inkubiert. Die Peptide wurden einzeln eingesetzt oder als Peptidgemische hinzugegeben (Tab. 2-10). Für eine Aktivierungskontrolle wurden die Zellen mit 1µg/ml Enterotoxin B aus *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) inkubiert. 12 bis 18h vor Ende der Inkubation wurde je Kavität 1µCi Tritium-markiertes Thymidin hinzugegeben. Nach einer Gesamtinkubationsdauer von 72h wurden die Platten bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit einem Packard Harvester Filtermate 196 auf Szintillationsfilterplatten gemäß den Angaben des Herstellers übertragen, gewaschen und anschließend an einem Szintillationszähler gemessen. Proliferationstests mit Milzzellsuspensionen wurden fünfmal durchgeführt, Proliferationstests mit separierten CD8a⁺ T Zellen zweimal.

Analyse antigenspezifischer CD8⁺ T Zellen durch intrazelluläre Zytokinfärbung

1x10⁶ Zellen einer Milzzellsuspension wurden in Anwesenheit von 0,5 oder 5µM Peptid oder ohne Peptid für insgesamt 10h bei 37°C inkubiert. Für die Positivkontrolle wurden 5ng/ml PMA und 10µg/µl Ionomycin eingesetzt. Um die Sekretion von synthetisiertem IFN-γ zu verhindern, wurden nach 4h Peptidinkubation 5µg/ml Brefeldin A (BFA) dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (6min, 4°C, 500x g) und mit FACS-Puffer gewaschen.

Für die Detektion epitopspezifischer, IFN-γ-sezernierender CD8⁺ T Zellen wurden die Zellen zur Verhinderung unspezifischer Aktivierung zunächst mit 15µg/ml anti-Fcγ-Rezeptor (CD16 / CD32) für 10min auf Eis vorinkubiert, für weitere 30min wurde anti-CD8a-FITC hinzugegeben. Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (6min, 4°C, 500x g) und 10min bei Raumtemperatur mit 2% Paraformaldehyd / PBS fixiert. Anschließend wurde mit 0,1% Saponin / FACS-Puffer gewaschen (6min, 4°C, 500x g). Die Inkubation mit anti-IFN-γ-PE in 0,1% Saponin / FACS-Puffer erfolgte 30min bei Raumtemperatur (Tab. 2-9). Anschließend wurde mit FACS-Puffer gewaschen (6min, 4°C, 500x g) und die Zellen wurden in 300µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte am FACSCalibur, die Auswertung mit dem Programm CellQuestPro.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolation von Gesamt-RNA

HL-1, C4 und Raw264.7 Zellen wurden mit 20µg/ml poly (I:C), 50U/ml IFN- γ oder 50U/ml IFN- β für maximal 24h behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend geerntet (10min, 4°C, 200x g). Für die Untersuchung des Transkriptionsniveaus verschiedener Gene, die für Proteine der Antigenprozessierung und -präsentation codieren, wurde Gesamt-RNA isoliert. Die Isolation erfolgte aus 1 bis 2x10⁶ Zellen gemäß den Angaben des Herstellers (High Pure RNA Isolation Kit / Roche). Die Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt, die Qualität in einer Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen überprüft (Sambrook 1989).

2.7.2 Die Synthese von cDNA

Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 2,0µg Gesamt-RNA und 100pmol Oligo [dT]₁₅ Nukleotide 10min bei 65°C denaturiert. 20U Protector RNase Inhibitor, 10U Transcriptor Reverse Transkriptase und 1mM dNTPs wurden hinzugegeben. Die Synthese erfolgte in Transcriptor Reaktionspuffer bei 55°C für 30min. Abschließend wurde 5min bei 85°C inkubiert, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit / Roche).

2.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte erfolgte mittels PCR mit spezifischen Oligonukleotiden (Tab. 2-11). Dafür wurden 1-2µl cDNA, 2,5mM MgCl₂, 200µM dNTPs, je 50pmol Vorwärts- und Rückwärtsoligonukleotide in PCR-Reaktionspuffer in einem Reaktionsvolumen von 50µl gemischt. 2,5U Taq-Polymerase wurden je Reaktionsansatz hinzugegeben. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95°C für 10min. Denaturierung (0,5 bis 1min), Hybridisierung (55 bis 65°C für 0,5 bis 1min) und Elongation (72°C für 0,5 bis 1min) wurden 25 bis 30mal wiederholt. Die finale Elongationszeit betrug 5min bei 72°C. Die Hybridisierungstemperatur und -dauer wurde in Abhängigkeit von der Sequenz der Oligonukleotide gewählt, die Elongationsdauer in Abhängigkeit von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz.

Tab. 2-11. Verwendete synthetische Oligonukleotide für die PCR. *fwd bezeichnet die Vorwärtsoligonukleotide, **rev die Rückwärtsoligonukleotide. τ_m [°C] steht für die Schmelztemperatur der Oligonukleotide, Länge [bp] bezeichnet die Produktlänge in Basenpaaren.

Bezeichnung	Gen	Sequenz 5'→3'	τ_m [°C]	Länge [bp]
$\alpha 4$ -fwd*	Psm $\alpha 7$	ATG CAA GGA TAG TCA TCA ACA GA		
$\alpha 4$ -rev**		CTT GAG CGG CTG ATC CCG	65	419
i $\beta 5$ -fwd	Psm $\beta 8$	CCA GGA AAG GAA TGT TCA AAT TGA GAT G		
i $\beta 5$ -rev		TTG ACG ACT CCT CCA GAA TAG TTG TC	65	561
TLR-fwd	Tlr3	CTA TGG ATT CTT CTG GTG TCT		
TLR-rev		TAA GTG GAT TTG ATG ACA AGT C	56	580
GAPDH-fwd	Gapdh	ATT TGG CCG TAT TGG GCG CCT G		
GAPDH-rev		GCT TCA CCA CCT TCT TGA TGT CAT CA	66	761

2.7.4 Elektrophoretische Trennung von DNA

Probenpuffer: 5% (v/v) Glycerol / 5mM Na₂-EDTA pH8,0 / 0,1% (w/v) Bromphenolblau / 0,1% (w/v) Xylencyanol

TAE (pH8,0): 40mM Tris/HCl / 20mM Essigsäure / 1mM EDTA

Die zu analysierenden Proben nach einer PCR wurden mit Probenpuffer versetzt, auf ein 1%iges Agarosegel, dem 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid zugesetzt waren, geladen und elektrophoretisch mit einer Spannung von 5V/cm Elektrodenabstand getrennt. Die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA ermöglichte die Detektion mittels UV-Licht.

2.7.5 Kultivierung von *Escherichia coli* BL21 (DE3)

LB-Medium: 1% (w/v) Bactotrypton / 0,5% (w/v) Hefeextrakt / 1% (w/v) NaCl

E. coli BL21 (DE3) (Tab. 2-12) wurde in LB-Medium bei 37°C und 180U/min kultiviert. LB-Agarplatten wurden durch den Zusatz von 1,5% (w/v) Agar hergestellt. Die Lagerung erfolgte als Glycerinkultur (50% (v/v) Glycerin) bei -80°C.

Tab. 2-12. Genotyp und Herkunft des für die Expression GST-fusionierter Proteine verwendeten *E. coli* Stamms.

Stamm	Genotyp	Herkunft
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (<i>r_B-m_B</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen

2.7.6 Transformation von *E. coli* BL21 (DE3) mit Plasmid-DNA

Herstellen kompetenter *E. coli* BL21 (DE3)

Φa-Medium: (0,5% (w/v) Hefeextrakt / 2% (w/v) Bactotrypton / 40mM MgSO₄ pH7,6

TfB-I-Medium: 30mM KOAc / 50mM MnCl₂ / 100mM RbCl₂ / 10mM CaCl₂ / 15% Glycerol pH5,8

TfB-II-Medium: 10mM MOPS / 10mM RbCl₂ / 75mM CaCl₂ / 15% Glycerol pH7,0

LB-Agarplatten wurden mit *E. coli* BL21 (DE3) angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. 5ml Φa-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180U/min angezogen. 250ml Φa -Medium wurden auf 37°C temperiert, mit der 5ml Über-Nacht-Kultur überimpft und bei 37°C und 180U/min bis zu einer optischen Dichte ($\lambda = 600\text{nm}$) von 0,5 angezogen. Die Kultur wurde 5min auf Eis abgekühlt und geerntet (5min, 4°C, 5000x g). Die Zellen wurden in 40ml eiskaltem TfBI-Medium resuspendiert, 15min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (5min, 4°C, 5000x g) und in 4ml TfB-II aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30min auf Eis wurden sie zu je 100µl aliquotiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Transformation mit Plasmid-DNA

SOC-Medium: 2% (w/v) Bactotrypton / 0,5% (w/v) Hefeextrakt / 10mM NaCl / 2,5mM KCl / 10mM MgSO₄ / 10mM MgCl₂ / 20mM Glucose

Tab. 2-13. Verwendete Expressionsvektoren für die heterologe Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21 (DE3). *m bezeichnet die Herkunft des klonierten Gens; Mus musculus. **MCS *multiple cloning site*.

Bezeichnung	Plasmid	Gen	Tag	MCS**	Herkunft
pGEX-2T•mPA28 α *	pGEX-2T	Psme1	GST	BamHI/EcoRI	A. Soza / AG Kloetzel
pGEX-4T-3•mPA28 β *	pGEX-4T-3	Psme2	GST	EcoRI/XhoI	A. Soza / AG Kloetzel

100 μ l kompetenter *E. coli* BL21 (DE3) wurden auf Eis aufgetaut und 45min mit 300ng Plasmid-DNA (Tab. 2-13) auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45sec, 42°C) wurden die Zellen 10min auf Eis stehengelassen. 1ml vorgewärmtes SOC-Medium wurde hinzugegeben und 1h bei 37°C unter leichtem Schütteln (500U/min) inkubiert. Für die Selektion der Transformanten wurden verschiedene Verdünnungen auf ampicillinhaltigen (100 μ g/ml) LB-Agarplatten ausgespatelt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.7.7 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Lysepuffer: 50mM Tris/HCl pH7,5 / 0,1M NaCl / 2mM KCl / 0,5mM DTT / Complete®

Thrombinpuffer: 50mM Tris/HCl pH7,6 / 0,1M NaCl / 0,5mM DTT

TEAD: 20mM Tris/HCl pH 7,2 / 1mM Na₂-EDTA / 1mM Na-Azid / 1mM DTT

Zur heterologen Expression der murinen PA28 Untereinheiten α und β in *E. coli* BL21 (DE3) wurden ampicillinhaltige LB-Agarplatten mit den Transformanten angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 5ml LB-Vollmedium, dem 100 μ g/ml Ampicillin zugesetzt wurden, wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C bei 180U/min kultiviert. Mit dieser Über-Nacht-Kultur wurden 50ml LB-Medium angeimpft und wiederum über Nacht bei 180U/min angezogen. 500ml Kulturen wurden mit 10ml dieser 50ml Vorkultur überimpft und bis zu einer Dichte ($\lambda = 600$ nm) von 0,5 kultiviert. Zur Induktion der Expression von PA28 α oder PA28 β wurden 0,5mM IPTG hinzugegeben. Die Kulturen wurden weitere 4h bei 37°C und 180U/min inkubiert und anschließend geerntet (10min, 4°C, 6000x g). Die Zellen wurden in 30ml Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,01% Nonidet P-40, 0,2mg/ml Lysozym und 0,2mg/ml DNaseI wurde 15min auf Eis inkubiert, gefolgt von vier Ultraschallbehandlungen für je 30sec. Nach

Zentrifugation (30min, 4°C, 6000x g) wurde der Überstand mit 1/2 Volumen Gluthation-Sephrose 2h bei 4°C rotierend inkubiert. Nach Zentrifugation (10min, 4°C, 650x g) wurde die Sepharose einmal mit zwei Volumen Lysepuffer, zweimal mit zwei Volumen Thrombinpuffer gewaschen und anschließend in zwei Volumen Thrombinpuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 10U/ml biotinyliertem Thrombin wurde bei 4°C über Nacht rotierend inkubiert. Nach Zentrifugation (10min, 4°C, 650x g) wurde der Überstand mit 1ml äquilibrierter Streptavidin-Agarose 1h bei 4°C inkubiert, zentrifugiert (10min, 4°C, 650x g) und der Überstand nochmals mit 1ml Streptavidin-Agarose inkubiert. Nach Zentrifugation der Agarose (10min, 4°C, 650x g) wurde der Überstand konzentriert (MW *cut off* 10000) und in TEAD aufgenommen. Dieses PA28 α - oder PA28 β -haltige Konzentrat wurde auf eine HiTrap Q XL Säule geladen und mit einem linearen Gradienten (0 bis 0,5M NaCl / TEAD) in 25 Säulenvolumen eluiert. Nach Konzentration (MW *cut off* 10000) wurden 200 μ g PA28 α und 227 μ g PA28 β (molares Verhältnis PA28 α : PA28 β = 1:1,3) 30min auf Eis zur Rekonstitution des PA28 Heptamers inkubiert und auf eine Superdex 200 10/300 GL Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem Säulenvolumen 0,15M NaCl / TEAD. Die PA28 Aktivität wurde wie beschrieben bestimmt (2.5.7). Die Fraktionen, die das funktionelle Heptamer enthielten, wurden vereinigt, konzentriert (MW *cut off* 30000) und die Konzentration anschließend im BCA-Test (2.5.2) bestimmt.

2.8 Software und Datenbanken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Datenbanken und Programme genutzt:

Densitometrische Auswertungen erfolgten mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Die Analyse massenspektrometrischer Daten erfolgte mit den Programmen XCalibur, Bioworks (beide Thermo Fisher Scientific) und Paws (Genomic Solutions®).

Für die Durchflusszytometrie wurden die Programme CellQuest™ und CellQuest™ Pro (BD Biosciences) genutzt.

Für die Generierung von Oligonukleotiden für die PCR wurde OligoCalc genutzt.
(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

Mit dem Algorithmus SYFPEITHI der Universitäten Heidelberg und Tübingen wurden potentielle Epitope aus der Aminosäuresequenz des CVB3 vorhergesagt.
(<http://www.syfpeithi.de/>)

Für die Vorhersage der TAP Transportwahrscheinlichkeit wurde ein Algorithmus der Arbeitsgruppe Prof. Holzhütter (Charité Universitätsmedizin Berlin, Mathematische Systembiologie) genutzt (Peters 2003).

Swiss Institute of Bioinformatics (<http://expasy.org/>)

European Bioinformatics Institute und Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.ensembl.org>)

3 Ergebnisse

3.1 Computerbasierte Vorhersagen H-2^b-restringierter Epitope aus CVB3

CD8⁺ T Lymphozyten erkennen ihr Antigen nur, wenn dieses durch MHC Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Die polymorphen Bereiche der MHC Moleküle bestimmen, welche Peptide binden können. Durch Poolsequenzierungen eluierter Peptide konnten Bindungsmotive der MHC Moleküle bestimmt werden. C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse sind Mäuse des H-2^b-Haplotyps (H-2D^b / H-2K^b). H-2D^b-restringierte Epitope sind neun oder zehn Aminosäuren lang, die Ankerpositionen sind mit Asparagin an Position fünf und Methionin an Position neun belegt. Bei H-2K^b-präsentierten Epitopen handelt es sich um Oktamere, deren Ankerpositionen fünf und acht mit Phenylalanin und Leucin belegt sind (Falk 1991). Basierend auf Ergebnissen der Poolsequenzierungen wurden Programme entwickelt, mit denen sich potentielle T Zellepitope aus Proteinen vorhersagen lassen (*matrix based prediction*). Die Grundlage des Algorithmus für das hier genutzte SYFPEITHI sind prozessierte Epitope und Peptide, von denen bekannt ist, dass sie an MHC Klasse I Moleküle binden. Es wird also die Übereinstimmung einer Sequenz mit der von bekannten bindenden Peptiden reflektiert und jeder Aminosäure wird in Abhängigkeit von ihrer Position im Epitop ein bestimmter Wert zugeordnet (Rammensee 1999).

Die Aminosäuresequenz des Polyproteins des CVB3 *Nancy* Stammes wurde mit dem Vorhersageprogramm SYFPEITHI hinsichtlich H-2D^b- und H-2K^b-restringierter Epitope analysiert. Aus dem *scoring* Algorithmus ergab sich eine Vielzahl potentiell bindender Peptide. Da auch die Substratspezifität des TAP Transporters Einfluss auf die Epitoppräsentation nimmt und T Zellepitope eine höhere TAP Affinität zeigen als solche, die nicht vom TcR erkannt werden (Burgevin 2008), wurden die potentiellen T Zellepitope zusätzlich mit einem Vorhersageprogramm auf ihre Transportwahrscheinlichkeit überprüft (Peters 2003). Je höher beide Scoringwerte sind, desto wahrscheinlicher sind Bindung und Transport des Epitops.

Die Ergebnisse der beiden Vorhersagen wurden kombiniert und schließlich solche potentiellen Epitope ausgewählt, deren MHC Klasse I- und TAP-Affinität einen hohen Scoringwert aufwiesen (Tab. 3-1).

Tab. 3-1. Ergebnisse der SYFPEITHI und TAP Vorhersage. Die Tabelle gibt die Bezeichnung der potentiellen Epitope an, mit der im Weiteren gearbeitet wird. Ferner sind die Aminosäuresequenz der vorhergesagten Epitope, deren Scoringwerte für MHC-Bindung und TAP-Transport und die MHC-Restriktion angegeben. Die Ankerpositionen in der Sequenz der potentiellen Epitope sind **rot** hervorgehoben. * VP2, Pol, P2C und 3C bezeichnen CVB3 Proteine, in deren Region die potentiellen Liganden lokalisiert sind: VP2 = Hüllprotein, Pol = RNA-abhängige RNA Polymerase, 3C = Picornain 3C, P2C = Protein 2C.

Bezeichnung*	Sequenz										MHC	TAP	Haplotyp
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Score	Score	
CVB3 VP2 _[248-256]	V	G	V	G	N	L	T	I	F		26	1,03	H-2D ^b
CVB3 Pol _[1901-1910]	A	S	S	L	N	D	S	V	A	M	25	0,14	H-2D ^b
CVB3 VP2 _[285-293]	F	R	H	N	N	V	T	L	M		25	0,21	H-2D ^b
CVB3 VP2 _[273-281]	M	P	Y	T	N	S	V	P	M		22	0,12	H-2D ^b
CVB3 P2C _[1175-1183]	Q	L	F	S	N	V	Q	Y	F		22	1,09	H-2D ^b
CVB3 VP2 _[284-292]	M	F	R	H	N	N	V	T	L		21	0,59	H-2D ^b
CVB3 VP2 _[128-135]	A	T	C	R	F	Y	T	L			23	0,49	H-2K ^b
CVB3 Pol _[2170-2177]	T	L	P	A	F	S	T	L			23	0,43	H-2K ^b
CVB3 3C _[1561-1568]	E	Y	G	E	F	T	M	L			22	0,45	H-2K ^b

Ausgewählt wurden potentielle Epitope aus der Sequenz eines Capsidproteins (VP2), der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, der Protease Picornain 3C und des Proteins 2C. Es sind immundominante und subdominante Epitope anderer Viren für beide Haplotypen bekannt. Daher wurden die zu analysierenden potentiellen Epitope unabhängig von ihrer MHC-Restriktion ausgesucht.

3.2 Generierung potentieller CVB3 T Zellepitope durch 20S Proteasomen

Die Prozessierung antigener Peptide erfolgt durch das Ubiquitin-Proteasomen-System, wobei in der Regel der korrekte C-Terminus der Epitope generiert wird (Kloetzel 2004). Zunächst wurde daher untersucht, ob die vorhergesagten potentiellen Epitope oder deren N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide tatsächlich durch das Proteasom gebildet werden. Mit der Verwendung von Standard- und Immunoproteasomen wurde der Einfluss der Immununtereinheiten auf die Generierung von CVB3 Epitopen und deren Vorläuferpeptiden bestimmt. Um die Rolle von PA28 in der Generierung von CVB3 Epitopen zu untersuchen, wurden die Degradationsexperimente der CVB3 Polypeptidsubstrate durch 20S Proteasomen zusätzlich in Gegenwart von PA28 durchgeführt.

Die Generierung MHC Klasse I restringierter Epitope aus Polypeptidsubstraten durch gereinigte 20S Proteasomen *in vitro* ist in Qualität und Quantität mit der *in vivo* Generierung in intakten Zellen vergleichbar (Sijts 2000b; Schwarz 2000b; Eggers 1995). Daher wurden die Degradationsansätze *in vitro* mit synthetischen Polypeptidsubstraten und gereinigten 20S Proteasomen und isolierten PA28 Komplexen durchgeführt.

20S Proteasomen wurden aus T2 und T2.27mp Zellen isoliert. T2 Zellen weisen in der Region des MHC Klasse II Genortes eine Deletion auf und sind defizient für die dort codierten IFN induzierbaren Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 5$. Die Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ werden kooperativ in 20S *core* Partikel inkorporiert (Groettrup 1997). Deshalb kann man davon ausgehen, dass es sich bei 20S Proteasomen aus T2 Zellen um Standardproteasomen handelt. T2.27mp Zellen sind T2-Dreifachtransfektanten ($\beta 1^+$, $\beta 2^+$ und $\beta 5^+$) und enthalten einen großen Anteil an Immunoproteasomen (Kuckelkorn 1995; Groettrup 1997). 20S Proteasomen aus T2.27mp Zellen wurden daher als Immunoproteasomen betrachtet.

Die Reinheit der isolierten 20S Proteasomen wurde unter denaturierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen in der Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft, und die Aktivität der isolierten 20S Proteasomen mit fluorogenen Substraten bestimmt (Abb. 3-1).

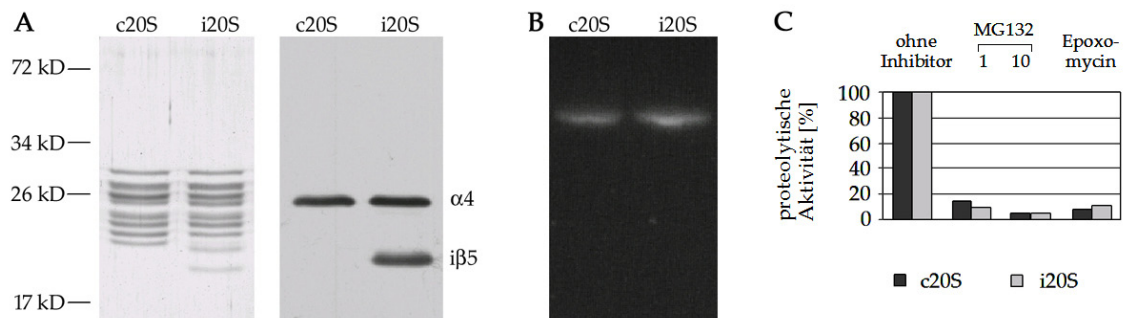


Abb. 3-1 Kontrolle der 20S Präparation aus T2 und T2.27mp Zellen. Je 1 μ g gereinigte 20S Proteasomen aus T2 und T2.27mp Zellen wurden auf Polyacrylamidgele geladen und die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Entweder wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blau R250 gefärbt (A links) oder im Western Blot hinsichtlich der Expression der proteasomalen Untereinheiten überprüft (A rechts). Für die Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurden je 4,0 μ g Standard- oder Immunoproteasomen auf ein Polyacrylamidgel geladen, anschließend mit 100 μ M Suc-LLVY-AMC überschichtet und die proteolytische Aktivität mittels UV-Licht detektiert (B). Für die Aktivitätsbestimmung wurden 1 μ g/ml isolierte 20S Proteasomen mit 50 μ M Suc-LLVY-AMC 1h bei 37°C inkubiert. Wurden Inhibitoren eingesetzt, so wurden die 20S Proteasomen mit dem Inhibitor (1 bzw. 10 μ M MG132; 0,2 μ M Epoxomycin) 30min auf Eis vorinkubiert. Die proteolytische Aktivität der 20S Proteasomen wurde als 100% definiert und darauf die verbleibende Aktivität nach Proteasomeninhibition bezogen (C). c20S bezeichnet 20S Proteasomen, die aus T2 Zellen isoliert wurden, i20S bezeichnet 20S Proteasomen aus T2.27mp Zellen.

Nach Färbung des Polyacrylamidgels mit Coomassie Brilliant Blau konnten Banden, die auf Kontaminationen mit anderen Proteinen schließen lassen, nicht detektiert werden (Abb. 3-1A links). Die Western Blot Analyse zeigt, dass iß5 nur in 20S Proteasomen nachgewiesen werden kann, die aus T2.27mp Zellen isoliert wurden (Abb. 3-1A rechts). Mit dem Nachweis der Untereinheit $\alpha 4$ wurde überprüft, ob gleiche Mengen Standard- und Immunoproteasomen auf das Gel aufgetragen wurden. Die Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen erlaubt die Detektion proteolytischer Aktivität im Gel. Diese wurde nur im Bereich von 20S Proteasomen beobachtet (Abb. 3-1B). In Aktivitätsbestimmungen der gereinigten 20S Proteasomen mit dem fluorogenen Peptid Suc-LLVY-AMC wurde die proteolytische Aktivität von Standard- und Immunoproteasomen mit 0,2µM Epoxomycin um ca. 90%, mit 1µM MG132 um 85% bei Standardproteasomen und 91% bei Immunoproteasomen und mit 10µM MG132 ca. 95% gehemmt. (Abb. 3-1C). Eine Koreinigung anderer Proteasen kann also ausgeschlossen werden.

3.2.1 Degradation von CVB3 Polypeptiden durch Standard- und Immunoproteasomen

Für *in vitro* Degradationsexperimente wurden synthetische Polypeptide, die die potentiellen Epitope enthielten, mit einer Länge von 25 bis 31 Aminosäuren synthetisiert (Tab. 3-2). Diese wurden mit isolierten 20S Standard- und Immunoproteasomen aus T2 und T2.27mp Zellen inkubiert, und die Reaktion im Zeitverlauf bis 24h gestoppt. Um Unterschiede im Substratabbau und in der Fragmentgenerierung erfassen zu können, wurden gleiche Mengen Standardproteasomen und Immunoproteasomen in den Degradationsexperimenten eingesetzt. Die Produkte der *in vitro* Degradation wurden in der *reversed phase* HPLC separiert und massenspektrometrisch analysiert. Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch Tandem-Massenspektrometrie-Analysen. Mit Hilfe des Programms Bioworks wurden die Daten ausgewertet und schließlich analog bewertet. So liessen sich für die prozessierten Polypeptide Schnittkarten erstellen (Abb. 3-2; Anhang Abb. 1, Anhang Abb. 2 und Anhang Abb. 3). Diese ermöglichten zunächst qualitative Aussagen, aber keine quantitative Bewertung.

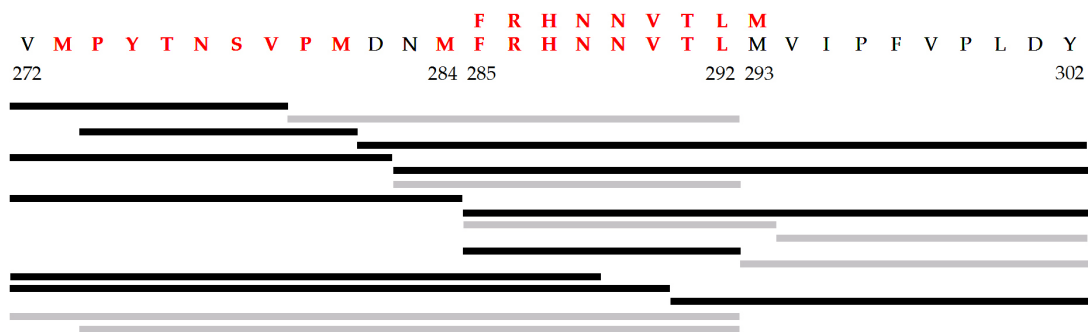
Tab. 3-2. In Degradationsexperimenten eingesetzte Polypeptidsubstrate. In der Tabelle sind die Bezeichnungen und Aminosäuresequenzen der Polypeptidsubstrate angegeben, die in *in vitro* Degradationsexperimenten verwendet wurden. Die potentiellen CD8⁺ T Zellepitope in den Aminosäuresequenzen sind **rot** hervorgehoben und die jeweilige Bezeichnung der Epitope genannt.

Polypeptid	Aminosäuresequenz	Epitop
CVB3 VP2 _[272-302]	V <u>MPY</u> TNSVPM <u>DN</u> <u>MFRHNNVTLM</u> VIPFVPLDY	CVB3 VP2 _[273-281]
		CVB3 VP2 _[284-292]
		CVB3 VP2 _[285-293]
CVB3 P2C _[1161-1190]	ATIEQSAPSQSDQE <u>OLF</u> SNVOYEAHYCRKY	CVB3 P2C _[1175-1183]
CVB3 3C _[1549-1576]	AMMKRNSRVKTEYGEFT <u>ML</u> GIYDRWAV	CVB3 3C _[1561-1568]
CVB3 Pol _[2158-2185]	RKIRSVPVGRCL <u>TLPAFSTL</u> RRKWLDSE	CVB3 Pol _[2170-2177]
CVB3 VP2 _[238-263]	QRYVNAGMGVGVGNLT <u>IE</u> PHQWINL	CVB3 VP2 _[248-256]
CVB3 Pol _[1892-1917]	AKGKSRLIE <u>ASSL</u> ND <u>SVAM</u> RQTFGNL	CVB3 Pol _[1901-1910]

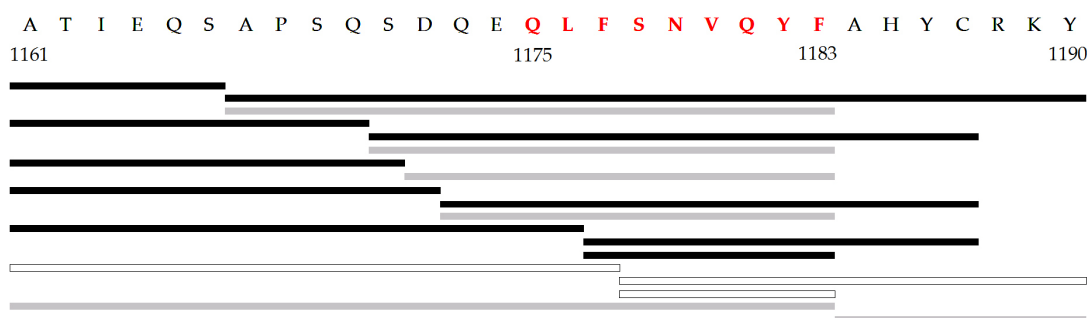
Alle Polypeptidsubstrate wurden durch Standard- und Immunoproteasomen, und in Gegenwart von PA28, vollständig degradiert. Die potentiellen H-2D^b-restringierten Epitope CVB3 VP2_[248-256] und CVB3 Pol_[1901-1910] aus den Polypeptidsubstraten CVB3 VP2_[238-263] und CVB3 Pol_[1892-1917] oder deren N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide wurden nicht detektiert (Anhang Abb. 1). Für die verbleibenden vier Substrate wurde der korrekte C-Terminus der potentiellen Epitope detektiert. Abb. 3-2 zeigt für diese Substrate verkürzte Schnitkarten.

Das Substrat CVB3 VP2_[272-302] enthält drei potentielle H-2D^b-restringierte T Zellepitope. Das potentielle Epitop CVB3 VP2_[285-293] und Epitopvorläufer für das in der Aminosäuresequenz überlappende potentielle Epitop CVB3 VP2_[284-292] wurden identifiziert. Auch das oktamere Fragment CVB3 VP2_[285-292] dieser beiden überlappenden Epitope konnte detektiert werden (Abb. 3-2A). In den Degradationsexperimenten mit den Substraten CVB3 Pol_[1161-1190], CVB3 P3C_[1549-1576] und CVB3 Pol_[2158-2185] wurden die Epitope, die C- und N-terminal flankierenden Fragmente und Epitopvorläufer identifiziert. Bei diesen untersuchten Substraten erfolgte die Generierung der immunrelevanten Fragmente durch Standard- und Immunoproteasomen, und auch in Gegenwart von PA28 (Abb. 3-2B, C+D).

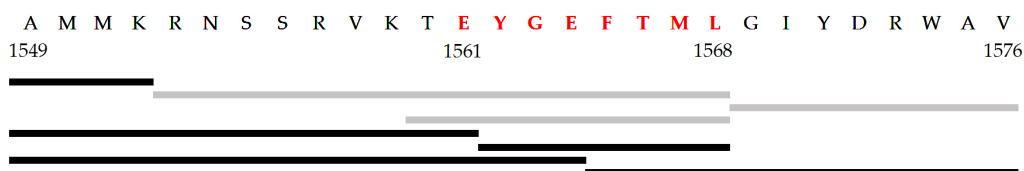
A CVB3 VP2_[272-302]



B CVB3 P2C_[1161-1190]



C CVB3 P3C_[1549-1576]



D CVB3 Pol_[2158-2185]

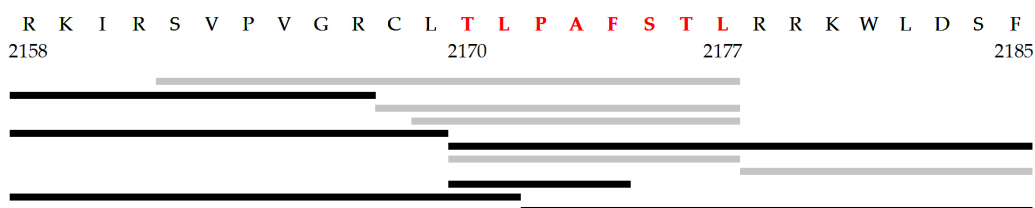


Abb. 3-2. Schnittkarten der CVB3 Polypeptidsubstrate nach Degradation durch 20S Proteasomen. Es sind die wesentlichen Fragmente für die Polypeptidsubstrate CVB3 VP2_[272-302] (A), CVB3 P2C_[1161-1190] (B), CVB3 3C_[1549-1576] (C) und CVB3 Pol_[2158-2185] (D) dargestellt. Potentielle H-2^b-restringierte Liganden, das C-terminal flankierende Fragment oder N-terminal verlängerte Epitopvorläufer sind in hellgrau abgebildet. Alle übrigen Fragmente sind in schwarz dargestellt. Weiße Fragmente wurden ausschließlich in Prozessierungen in Anwesenheit von PA28 detektiert (B).

Die jeweiligen Schnittkarten der einzelnen Polypeptidsubstrate aus Degradationsexperimenten mit Standard- oder Immunoproteasomen sind ähnlich. Qualitative Unterschiede ergaben sich aus der veränderten Kombination der Nutzung von Schnittstellen durch Immunoproteasomen. Schnittstellen, die ausschließlich durch Immunoproteasomen genutzt wurden und so zur Generierung von Fragmenten in Abhängigkeit von Immununtereinheiten führten, wurden nicht identifiziert. Qualitative Veränderungen in Gegenwart von PA28 basieren ebenfalls auf einer Verschiebung der Schnittstellennutzung, und nur in Ausnahmen in der exklusiven Nutzung von Schnittstellen, wie zum Beispiel bei der Hydrolyse der Peptidbindung zwischen F_[1177]-S_[1178] im Polypeptidsubstrat CVB3 P2C_[1161-1190].

Die Inkorporation der Immununtereinheiten und die Assoziation von PA28 und dem 20S *core* Partikel tragen zu einem leicht veränderten Peptidpool bei. Die möglichen quantitativen Unterschiede wurden näher analysiert. Im Folgenden wird dabei nur auf diejenigen Substrate eingegangen, bei denen potentielle Epitope oder N-terminal verlängerte Epitopvorläufer detektiert wurden.

3.2.2 Einfluss der Immununtereinheiten auf die Substratabbaurate und die Fragmentgenerierung

Alle eingesetzten Polypeptidsubstrate wurden sowohl durch Standard- als auch durch Immunoproteasomen vollständig degradiert. Verglichen mit Standardproteasomen aus T2 Zellen wurden die Polypeptidsubstrate durch Immunoproteasomen aus T2.27mp Zellen schneller degradiert (Abb. 3-3, Tab. 3-3). Durchschnittlich liess sich eine dreifache Erhöhung der Substratumsatzrate beobachten. Abhängig vom eingesetzten Substrat lagen die Halbwertszeiten bei Degradationen durch Standardproteasomen zwischen 1,5 und 6h, bei einem Abbau durch Immunoproteasomen zwischen 0,5 und 2h.

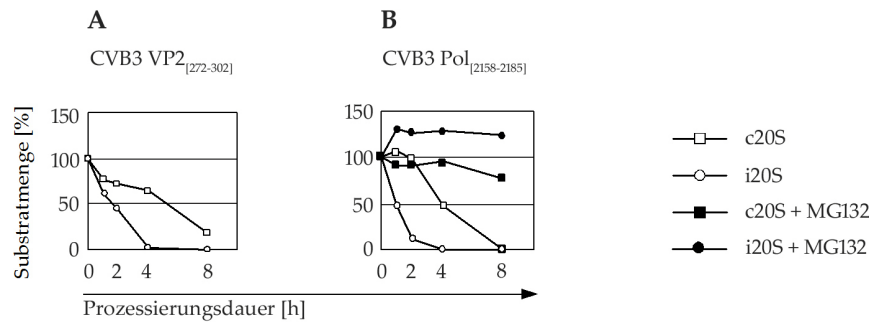


Abb. 3-3. Kinetik der Substratdegradation von synthetischen CVB3 Polypeptiden durch Standard- und Immunoproteasomen. Dargestellt ist die Substratmenge [%] in Abhängigkeit von der Zeit [h] für die Polypeptide CVB3 VP2_[272-302] (A), das ein potentielles H-2D^b-restringiertes Epitop enthält, und CVB3 Pol_[2158-2185] (B), das ein potentielles H-2K^b-präsentiertes Epitop enthält. Für *in vitro* Degradationsexperimente mit Proteasomeninhibitor wurden isolierte 20S Proteasomen und 50µM MG132 vor Zugabe des Substrates CVB3 Pol_[2158-2185] 30min auf Eis vorinkubiert. c20S bezeichnet Standardproteasomen aus T2 Zellen, i20S Immunoproteasomen, die aus T2.27mp Zellen isoliert wurden. Dargestellt ist das Ergebnis eines Degradationsexperimentes von mindestens drei unabhängigen Reaktionsansätzen.

Tab. 3-3. Halbwertszeiten der Substratdegradation durch Standard- und Immunoproteasomen. Die Tabelle gibt die Halbwertszeiten in Stunden ($t_{1/2}$ [h]) für solche Polypeptidsubstrate an, bei denen in den Degradationsansätzen potentielle immunrelevante Produkte detektiert werden konnten.

Peptid	$t_{1/2}$ [h]	
	c20S	i20S
CVB3 VP2 _[272-302]	6	2
CVB3 P2C _[1161-1190]	3,5	2
CVB3 3C _[1549-1576]	1,5	0,5
CVB3 Pol _[2158-2185]	4	1

Die Inkorporation der Immununtereinheiten in 20S Proteasomen bewirkt eine Veränderung der proteolytischen Aktivität und führt oft zu einer verbesserten Epitopgenerierung. Das kann sowohl auf eine erhöhte Substratumsatzrate zurückzuführen sein als auch auf eine veränderte Schnittpräferenz von Immunoproteasomen (Strehl 2008). Um den Einfluss der Immununtereinheiten auf die Bildung der potentiellen Epitope oder Epitopvorläuferpeptide zu charakterisieren, wurden diejenigen Produktmengen vergleichend analysiert, die zum Zeitpunkt des 50%igen Substratumsatzes vorlagen. Zugunsten der Übersichtlichkeit werden die Produkte je eines Polypeptids gezeigt, das ein potentielles H-2D^b- oder H-2K^b-restringiertes Epitop enthält. Repräsentativ für immunrelevante Fragmente wurden jeweils das potentielle Epitop mit den flankierenden Fragmenten und ein N-terminal verlängertes Epitopvorläuferpeptid ausgewählt.

Wird CVB3 VP2_[272-302] als Substrat verwendet, so konnten das Epitop und die flankierenden N- und C-Termini in Reaktionsansätzen mit Immunoproteasomen in einer höheren Intensität detektiert werden (Abb. 3-4A). Bei der Verwendung von CVB3 Pol_[2158-2185] als Substrat wurde das potentielle Epitop CVB3 Pol_[2170-2177] in einer vergleichbaren Menge durch Standard- und Immunoproteasomen generiert (Abb. 3-4B). Das Prolin an Position drei des potentiellen Epitops führt zu einer Reduktion der Wahrscheinlichkeit des TAP Transports, schließt diesen aber nicht generell aus (Uebel 1997; Burgevin 2008; Neefjes 1995). Der um zwei Aminosäuren verlängerte Epitopvorläufer CVB3 Pol_[2168-2177] wird in einer größeren Menge durch Immunoproteasomen gebildet, und auch das C-terminale Fragment konnte in Reaktionsansätzen mit Immunoproteasomen mit einer größeren Intensität detektiert werden (Abb. 3-4B). Bei einer N-terminalen Verlängerung verschiebt sich die Position des Prolins und ein Transport in das ER wird wahrscheinlicher.

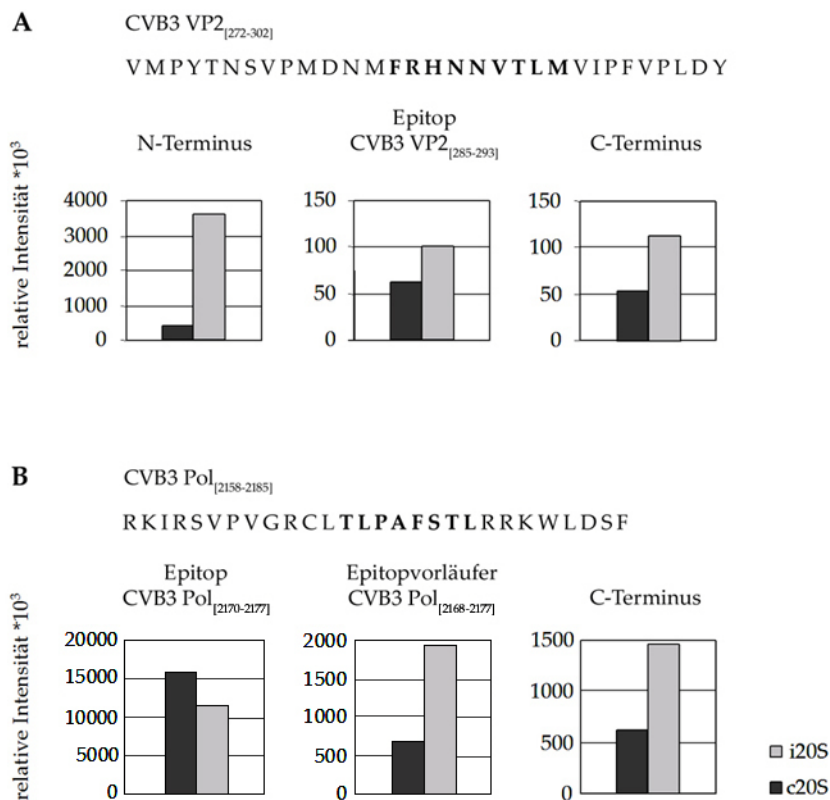


Abb. 3-4. *in vitro* Generierung potentieller H-2^b-restringierter Epitope oder Epitopvorläufer durch Standard- und Immunoproteasomen zum Zeitpunkt des 50%igen Substratabbaus. Als Substrate wurden die Polypeptide CVB3 VP2_[272-302] (A) und CVB3 Pol_[2158-2185] (B) eingesetzt. Dargestellt sind die relativen Intensitäten der beiden potentiellen Epitope, der flankierenden N- und C-Termini und eines N-terminal verlängerter Epitopvorläufer. Die Intensitäten der detektierten Fragmente zum Zeitpunkt des 50%igen Substratumsatzes wurden auf einen internen Standard normiert und sind als relative Intensitäten (*10³) dargestellt. c20S bezeichnet Standardproteasomen (in dunkelgrau dargestellt), i20S bezeichnet Immunoproteasomen (hellgrau in der Abbildung). Dargestellt ist jeweils das Ergebnis eines Degradationsexperimentes von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Neben Schnitten, die zur Epitopgenerierung oder zur Bildung von N-terminal verlängerten Epitopvorläuferpeptiden führten, wurden auch Schnitte detektiert, die zur Bildung von Fragmenten führten, die eine Epitopgenerierung unmöglich machten. Das Polypeptidsubstrat CVB3 VP2_[272-302] enthält zwei, jeweils neun Aminosäuren lange, H-2D^b-restringierte Epitope (CVB3 VP2_[284-292] und CVB3 VP2_[285-293]), deren Sequenzen um acht Aminosäuren überlappen. In der massenspektrometrischen Analyse konnte dieses oktamere Fragment CVB3 VP2_[285-292] als Degradationsprodukt identifiziert werden (Abb. 3-5A). Die Bildung des Oktamers verhindert die Generierung der potentiellen Epitope CVB3 VP2_[284-292] und CVB3 VP2_[285-293]. Auch in Degradationsexperimenten mit dem Substrat CVB3 Pol_[2158-2185] wurden epitopzerstörende Schnitte detektiert (Abb. 3-5B). Die Intensität dieser Fragmente, die die Bildung der Epitope unmöglich machen, sind in den Reaktionsansätzen mit Immunoproteasomen höher als in solchen mit Standardproteasomen, unabhängig vom eingesetzten Substrat (Abb. 3-5).

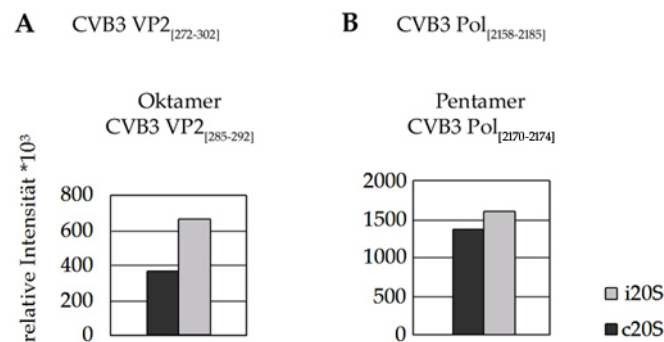


Abb. 3-5. *in vitro* Generierung von Fragmenten, die eine Epitopbildung verhindern, durch Standard- und Immunoproteasomen zum Zeitpunkt des 50%igen Substratabbaus. Für die Substrate CVB3 VP2_[272-302] (A) und CVB3 Pol_[2158-2185] (B) sind die relativen Intensitäten (*10³) von Fragmenten dargestellt, die durch Schnitte entstehen, die eine Generierung des Epitops oder von Epitopvorläuferpeptiden verhindern. Die Intensitäten beziehen sich auf den Zeitpunkt des 50%igen Substratumsatzes in Degradationsexperimenten mit Standard- (c20S, dunkelgrau) und Immunoproteasomen (i20S, hellgrau). Dargestellt ist jeweils das Ergebnis eines Degradationsexperimentes von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Betrachtet man die qualitativen und quantitativen Unterschiede in den Prozessierungen durch Standard- und Immunoproteasomen, so ergibt sich eine Verschiebung der Schnittpräferenz zugunsten hydrophober und basischer Aminosäuren (Abb. 3-2; Anhang Abb. 1, Anhang Abb. 2 und Anhang Abb. 3). Neben der erhöhten Substratumsatzrate führt das zu einer verbesserten Epitopgenerierung oder der verbesserten Bildung von N-terminal verlängerten Vorläuferpeptiden, deren C-Termini mit hydrophoben oder basischen Aminosäuren belegt sind, um eine stabile Interaktion mit dem MHC Klasse I Molekül zu gewährleisten.

3.2.3 Einfluss des Proteasomenaktivators PA28 auf die Substratabbaurate und Generierung immunrelevanter Fragmente

Für verschiedene Epitope viralen Ursprungs wurde gezeigt, dass PA28 die Präsentation der Epitope erhöht (Schwarz 2000a; Groettrup 1996; van Hall 2000). Über die Generierung von Epitopen des CVB3 ist bisher nichts bekannt. Daher wurde auch der Einfluss von PA28 auf die Bildung der potentiellen H-2^b-restringierten Liganden untersucht. Die Halbwertszeit des in Abb. 3-6 dargestellten Polypeptidsubstrates CVB3 VP2_[272-302] beträgt in Anwesenheit von PA28 weniger als 2h. Der Substratabbau ist in Gegenwart von PA28, unabhängig von der Art des Proteasoms, erhöht und Unterschiede in der Degradationskinetik zwischen Standard- und Immunoproteasomen konnten nicht mehr beobachtet werden.

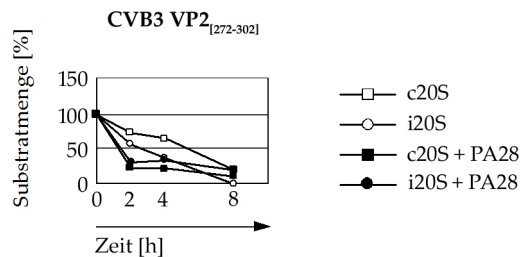


Abb. 3-6. Kinetik der Substratdegradation des Polypeptids CVB3 VP2_[272-302] durch Standard- und Immunoproteasomen in Anwesenheit von PA28. Dargestellt ist die Substratmenge [%] in Abhängigkeit von der Zeit [h] für das Substrat CVB3 VP2_[272-302]. c20S bezeichnet Standardproteasomen aus T2 Zellen, i20S Immunoproteasomen aus T2.27mp Zellen. Reaktionsansätze mit Standardproteasomen und PA28 sind als c20S + PA28 gekennzeichnet, solche mit Immunoproteasomen und PA28 als i20S + PA28. Dargestellt ist das Ergebnis eines Degradationsexperimentes von drei unabhängigen Versuchen.

Betrachtet man die Intensitäten der generierten Fragmente im zeitlichen Verlauf der Degradation von CVB3 VP2_[272-302], so konnten jeweils größere Mengen des potentiellen Epitops CVB3 VP2_[285-293] und größere Mengen des korrespondierenden C-Terminus in den Reaktionsansätzen mit PA28 detektiert werden, im Vergleich zu den Produktmenge aus Reaktionsansätzen ohne PA28 (Abb. 3-7A+B). Die Assoziation von PA28 an 20S Proteasomen verursacht eine höhere Substratumsatzrate, was zu einer größeren Menge immunrelevanter Fragmente zu frühen Abbaupunkten führt.

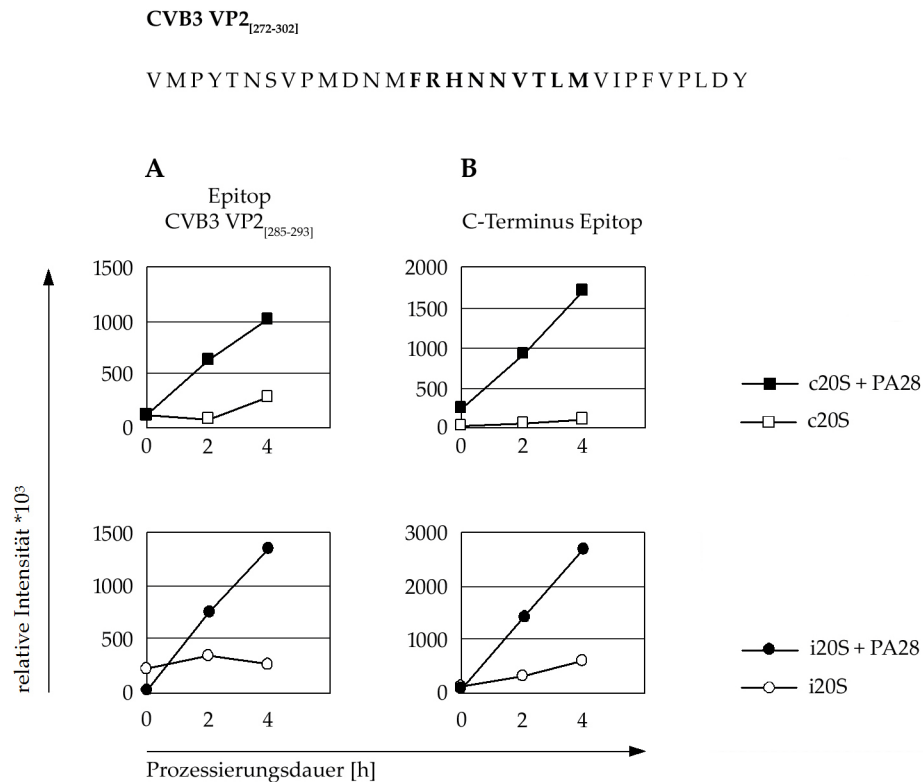


Abb. 3-7. Durch Standard- und Immunproteasomen generierte immunrelevante Fragmente in Abhängigkeit von der Zeit und in An- oder Abwesenheit von PA28. Dargestellt sind die relativen Intensitäten (*10³) der Produkte in Abhängigkeit von der Degradationsdauer [h] durch Standard- oder Immunproteasomen in Ab- oder Anwesenheit von PA28. Als Substrat wurde das Polypeptid CVB3 VP2_[272-302] eingesetzt. Gezeigt sind die Diagramme für das potentielle Epitop CVB3 VP2_[285-293] (A) und den flankierenden C-Terminus (B). Dargestellt ist das Ergebnis eines Degradationsexperimentes von drei unabhängigen Versuchen.

Vergleicht man die relativen Intensitäten der Produkte aus den Degradationsansätzen von Standard- und Immunproteasomen in Anwesenheit von PA28 bei einer Verdauzeit von 2h miteinander, so sind jeweils höhere Intensitäten in den Reaktionsansätzen mit PA28 zu beobachten (Abb. 3-8A). Die Unterschiede in der Produktgenerierung zwischen Standard- und Immunproteasomen bleiben damit auch in Gegenwart von PA28 bestehen, sie sind jedoch gegenüber Reaktionsansätzen ohne PA28 reduziert (Abb. 3-8B). Die verbesserte Generierung immunrelevanter Fragmente beruht damit nicht allein auf einer Erhöhung der Substratumsatzrate sondern zusätzlich auf einer Verschiebung der Schnittpräferenzen.

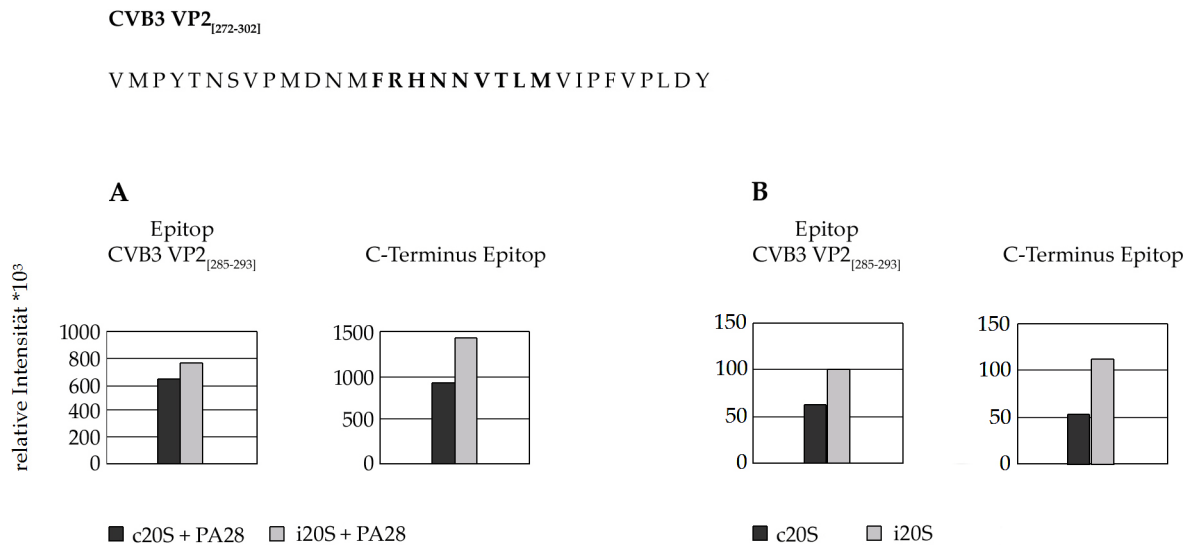


Abb. 3-8. Intensität der generierten immunrelevanten Fragmente nach 2h durch Standard- und Immunoproteasomen in An- oder Abwesenheit von PA28. Die Diagramme zeigen die relativen Intensitäten (*103) für das Epitop CVB3 VP2_[285-293] und den flankierenden C-Terminus in Reaktionsansätzen mit PA28 (A) oder ohne PA28 (B). Die Degradationsdauer von 2h entspricht dem Zeitpunkt des 50%igen Substratabbaus in Degradationsreaktionen mit 20S Proteasomen und PA28. 20S Proteasomen aus T2 Zellen sind in der Legende als c20S + PA28 für Reaktionsansätze mit PA28 und als c20S für Reaktionsansätze ohne PA28 angegeben, 20S Proteasomen aus T2.27mp Zellen mit i20S + PA28 oder i20S.

Für eine nähere Charakterisierung des Einflusses von PA28 auf die Generierung der Produkte wurden Quotienten gebildet: Die relativen Intensitäten der generierten Produkte durch 20S Proteasomen in Anwesenheit von PA28 wurden mit den relativen Fragmentintensitäten in Abwesenheit von PA28 ins Verhältnis gesetzt (Abb. 3-9).

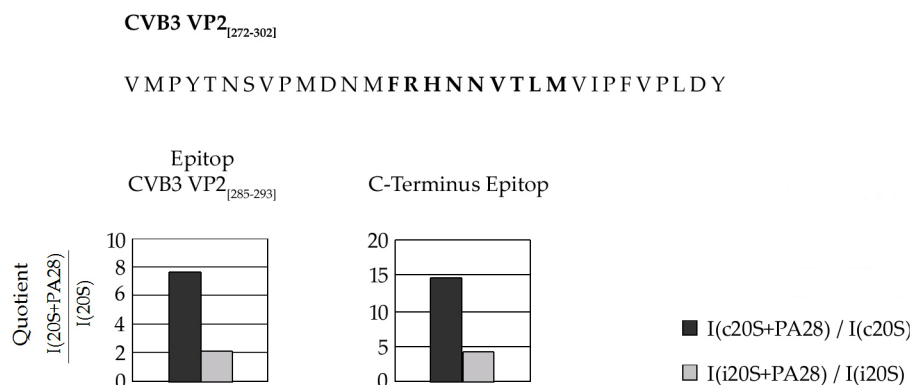


Abb. 3-9. Quotienten der Produktintensitäten aus Degradationsansätzen des Substrates CVB3 VP2_[272-302] mit Standard- und Immunoproteasomen mit und ohne PA28. Die Intensitäten (I) der generierten Fragmente zum Verdauzeitpunkt von 2h aus Reaktionsansätzen mit und ohne PA28 wurden miteinander ins Verhältnis gesetzt, jeweils für 20S Proteasomen aus T2 Zellen und 20S Proteasomen aus T2.27mp Zellen. Eine Prozessierungsdauer von 2h entspricht dem 50%igen Substratumsatz für Reaktionsansätze mit PA28.

Für einen positiven Einfluss auf die Produktgenerierung durch PA28 erhält man Quotienten, die größer sind als eins. Nach Assoziation von PA28 und Standardproteasomen wurde achtmal mehr des potentiellen Epitops CVB3 VP2_[285-293] in der gleichen Verdauzeit gebildet als ohne PA28. Durch Immunoproteasomen wurde in Anwesenheit von PA28 zweimal soviel gebildet (Abb. 3-9). Deutlicher noch wurde der Unterschied bei der Betrachtung der Generierung des epitopflankierenden C-terminalen Fragments: In der gleichen Verdauzeit wurde eine 15fach erhöhte Menge in Gegenwart von PA28 durch Standardproteasomen gebildet, durch Immunoproteasomen fünfmal mehr in Anwesenheit von PA28. Wie durch die Quotienten gezeigt, ist der Einfluss von PA28 auf Standardproteasomen größer als auf Immunoproteasomen.

Bezüglich der Generierung potentieller CVB3 Epitope lässt sich zusammenfassend feststellen, dass nicht alle vorhergesagten CVB3 Liganden proteasomal generiert werden. Für die, die durch 20S Proteasomen generiert wurden, wurde eine verbesserte Bildung durch Immunoproteasomen nachgewiesen. Das ist auf die höhere Substratumsatzrate und auf eine veränderte Schnittpräferenz der Immunoproteasomen zurückzuführen. Die Assoziation von PA28 an den 20S *core* Partikel führt zu einer schnelleren Substratdegradation. Die Degradationsrate ist dann unabhängig vom Typ des 20S Proteasoms und in der Regel höher als die von Immunoproteasomen. Standardproteasomen werden in der Degradationsrate durch die Assoziation von PA28 wesentlich stärker beeinflusst als Immunoproteasomen, und es wird eine vergleichsweise stärkere Zunahme immunrelevanter Fragmente detektiert. Da die potentiellen Epitope oder die N-terminal verlängerten Epitopvorläufer auch durch Standardproteasomen generiert werden, können mit der Erhöhung des Substratumsatzes nach Assoziation von PA28 die durch die Inkorporation der Immunountereinheiten in 20S Proteasomen erreichten proteolytischen Veränderungen teilweise kompensiert werden.

3.3 Struktur- und Funktionsanalyse von 20S Proteasomen aus Organen

3.3.1 Zusammensetzung von 20S Proteasomen in Organen

Nach einer Infektion mit CVB3 entwickeln C57BL/6 Mäuse eine akute Myokarditis, die nach der Elimination infizierter Zellen ausheilt. A.BY/SnJ Mäuse eliminieren die Viruspartikel nicht vollständig und entwickeln häufig eine chronische Verlaufsform (Klingel 2003; Szalay 2006b). Infektionen mit Pathogenen bewirken eine veränderte Zusammensetzung von 20S Proteasomen am Ort der Infektion, die eine veränderte proteolytische Aktivität bedingt (Strehl 2006). Für die Untersuchung der infektionsbedingten Veränderungen von 20S Proteasomen in Organen wurden C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse mit 1×10^5 PFU CVB3 infiziert, am Tag 4 und 8 nach CVB3 Infektion getötet und Herzen und Milzen entnommen. Als Kontrolle wurden naive Tiere getötet und die Organe entnommen.

20S Proteasomen aus Herzen

Herzen wurden homogenisiert und die Expression der Immununtereinheiten $i\beta 1$, $i\beta 2$ und $i\beta 5$ zunächst in den Homogenaten mittels Western Blot untersucht (Abb. 3-10). Die Infektion mit CVB3 hat eine starke Expression von $i\beta 1$, $i\beta 2$ und $i\beta 5$ in C57BL/6 am Tag 4 nach Infektion induziert. Im weiteren Verlauf war ein Rückgang auf das Niveau der nicht-infizierten Mäuse zu verzeichnen. In den Herzlysaten der A.BY/SnJ Mäuse nahm die Menge an $i\beta 1$, $i\beta 2$ und $i\beta 5$ im Verlauf der CVB3 Infektion zu. Eine starke Induktion konnte am Tag 8 beobachtet werden. Die Expression von $\alpha 4$, und damit die Gesamtmenge der 20S Proteasomen, wurde in beiden Mausstämmen nicht beeinflusst.

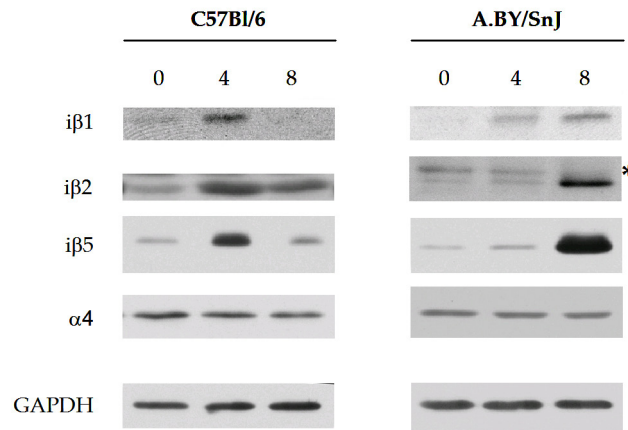


Abb. 3-10. Western Blot Analyse des Gesamtproteinextraktes aus Herzen nicht-infizierter und CVB3 infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse. Herzen nicht-infizierter und CVB3 infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse wurden homogenisiert und je 25µg Gesamtproteinextrakt auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Die Proteine wurden im *semi dry* Elektrophoretungsverfahren auf eine PVDF Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern, die gegen die proteasomalen Untereinheiten iβ1, iβ2, iβ5 und α4 gerichtet waren. GAPDH diente als Ladekontrolle. 0 bezeichnet die Organentnahme aus nicht-infizierten Mäusen, 4 und 8 die Tage der Organentnahme nach CVB3 Infektion. * = unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers. Dargestellt ist eine repräsentative Western Blot Analyse von vier unabhängigen Versuchen.

Eine Unterscheidung zwischen freien und inkorporierten proteasomalen Untereinheiten ist in der Analyse von Organhomogenaten nicht möglich. Daher wurden 20S Proteasomen aus Herzlysaten immunpräzipitiert und in den folgenden Western Blot Analysen die Immununtereinheiten nachgewiesen. Abb. 3-11 zeigt als Beispiel die Western Blot Analyse für iβ5 nach Präzipitation von 20S Proteasomen. In beiden Mausstämmen entspricht die Inkorporation der Untereinheit iβ5 der Expression, die in den Homogenaten beobachtet wurde. Die Ergebnisse für die Untereinheiten iβ1 und iβ2 sind analog (keine Abbildung).

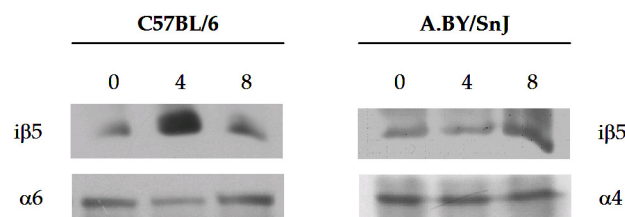


Abb. 3-11. Western Blot Analyse immunpräzipitierter 20S Proteasomen aus Herzen von nicht-infizierten und CVB3 infizierten C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen. 20S Proteasomen wurden mit einem gegen den 20S *core* Partikel gerichteten Antikörper (K08) aus Herzhomogenaten nicht-infizierter und infizierter Mäuse immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und im *semi dry* Elektrophoretungsverfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis proteasomaler Untereinheiten erfolgte mit Antikörpern, die gegen die Untereinheiten iβ5, α4 und α6 gerichtet waren. α4 bzw. α6 wurden jeweils als Präzipitationskontrolle verwendet. 0 bezeichnet nicht-infizierte Tiere, 4 und 8 bezeichnen die Tage nach CVB3 Infektion.

Da der IFN induzierbare Proteasomenaktivator PA28 einen positiven Einfluss auf die Generierung potentieller CVB3 Liganden hatte, wurde die Expression der Untereinheiten PA28 α und PA28 β ebenfalls untersucht. Western Blot Analysen von Herzgewebekomogenaten zeigten für beide Stämme einen vergleichbaren Verlauf der Expression von PA28 α und PA28 β wie die Expression der Immununtereinheiten. In C57BL/6 Mäusen wurde PA28 β am Tag 4 nach Infektion induziert, und im weiteren Verlauf der Infektion nahm die Proteinmenge wieder ab. In Herzhomogenaten der A.BY/SnJ Mäuse war eine Induktion erst am Tag 8 nach Infektion zu beobachten (Abb. 3-12). Das Ergebnis für PA28 α in A.BY/SnJ Mäusen war entsprechend. In C57BL/6 wurde PA28 α während der untersuchten Zeitpunkte nicht induziert: Die Menge an PA28 α Protein in Herzhomogenaten von Tag 0 und 4 war gleich, und leicht reduziert am Tag 8 nach Infektion (nicht gezeigt).

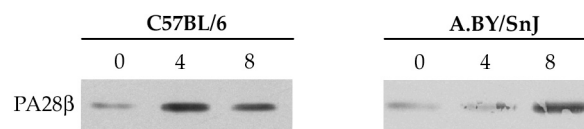
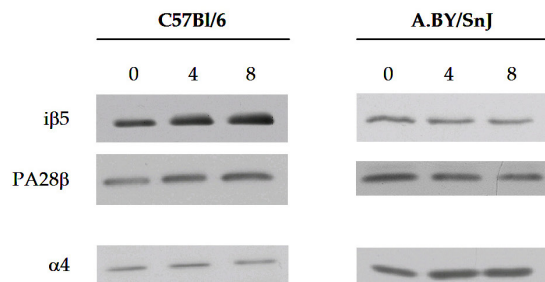


Abb. 3-12. Analyse der Expression von PA28 β in Herzgewebekomogenaten von nicht-infizierten und CVB3 infizierten C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen. Je 25 μ g Gesamtproteinextrakt aus Herzen wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel geladen und anschließend mittels Immunoblot analysiert. Zur Detektion wurden Antikörper genutzt, die gegen PA28 β gerichtet waren. Die Tage nach CVB3 Infektion sind mit 4 und 8 bezeichnet, 0 bezeichnet die Organentnahme aus nicht-infizierten Tieren.

20S Proteasomen aus Milzen

Die Expression der proteasomalen Immununtereinheiten und der Untereinheiten von PA28 wurde auch in Milzen nicht-infizierter und CVB3 infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse untersucht. In C57BL/6 Mäusen wird die Untereinheit i β 5 im Infektionsverlauf bis Tag 8 schwach induziert. In A.BY/SnJ Mäusen ist die Menge an i β 5 Protein gleichbleibend. Das Ergebnis für PA28 β ist analog (Abb. 3-13A), und auch für die proteasomalen Untereinheiten i β 1 und i β 2 sowie für PA28 α (keine Abbildung). Die Expression der proteasomalen Untereinheit α 4 wird durch die Infektion nicht beeinflusst. Die Zusammensetzung der 20S Proteasomen aus Milzen änderte sich während der CVB3 Infektion nicht wesentlich. Abb. 3-13B zeigt die Western Blot Analyse präzipitierter 20S Proteasomen. Der Anteil inkorporierter i β 5 Untereinheiten ist nach Infektion mit CVB3 in beiden Mausstämmen nahezu unverändert.

A Western Blot Gesamtproteinextrakt



B Immunpräzipitation 20S Proteasomen

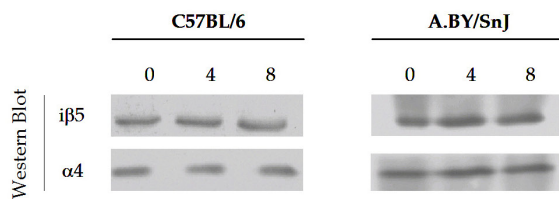


Abb. 3-13. Analyse der Expression von $i\beta 5$ und PA28 β in Milzen aus nicht-infizierten und CVB3 infizierten C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen. Milzen wurden nicht-infizierten und infizierten C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen entnommen und homogenisiert. Je 25 μ g wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen und nach der Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen im Western Blot analysiert. Mit Antikörpern, die gegen $i\beta 5$, PA28 β und $\alpha 4$ gerichtet waren, wurden die jeweiligen Proteine detektiert (A). Aus je 100 μ g Gesamtproteinextrakt wurden 20S Proteasomen immunpräzipitiert (Antikörper K08). Die Zusammensetzung der präzipitierten 20S Proteasomen wurde nach denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese mittels Immunoblot analysiert (B).

Nach Infektion von C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen mit CVB3 veränderte sich die Zusammensetzung der 20S Proteasomen in Herzen, nicht aber in Milzen. Die infektionsbedingten Veränderungen in der Zusammensetzung der 20S Proteasomen zeigten in den beiden Mausstämmen einen unterschiedlichen Verlauf: Bei 20S Proteasomen aus Herzen der A.BY/SnJ Mäuse war eine zeitliche Verschiebung zum Tag 8 nach Infektion zu beobachten.

3.3.2 Funktionelle Analyse der 20S Proteasomen aus Organen

Die Prozessierung von Antigenen ist abhängig von der Menge inkorporierter Immununtereinheiten in 20S Proteasomen (Sijts 2000b). Wie die quantitative Auswertung der Degradationsexperimente mit CVB3 Polypeptidsubstraten und 20S Proteasomen aus T2 und T2.27mp Zellen gezeigt hat, haben die Immununtereinheiten einen positiven Einfluss auf die Generierung immunrelevanter Fragmente (3.2.2). Daher wurde untersucht, welche Auswirkung die zeitlich unterschiedliche Induktion der Immununtereinheiten in den Herzen der beiden Mausstämmen auf die Generierung immunrelevanter Fragmente hat. 20S Proteasomen wurden aus Herzen und Milzen nicht-infizierter und infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse isoliert und *in vitro* Degradationsexperimenten mit synthetischen CVB3 Polypeptidsubstraten eingesetzt. Dargestellt sind im Folgenden die Ergebnisse der Degradationsexperimente mit den Substraten CVB3 VP2_[272-302] und CVB3 Pol_[2158-2185], die bereits bei der Analyse des Schnittverhaltens von Standard- und Immunoproteasomen gezeigt wurden.

Abb. 3-14 zeigt die wesentlichen Produkte der Degradation des Polypeptidsubstrates CVB3 VP2_[272-302] durch 20S Proteasomen, die aus Milzen nicht-infizierter und infizierter C57BL/6 Mäuse isoliert wurden.

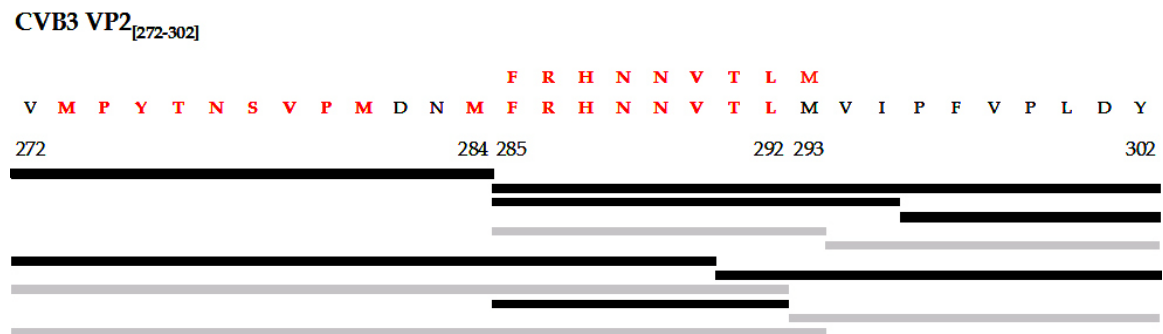


Abb. 3-14. Verkürzte Schnittkarte des Polypeptidsubstrates CVB3 VP2_[272-302]. Die Produkte einer *in vitro* Degradation durch 20S Proteasomen aus Milzen nicht-infizierter und CVB3 infizierter C57BL/6 Mäuse sind dargestellt. Immunologisch relevante Fragmente sind in grau, alle anderen in schwarz dargestellt.

Die Schnittkarten der Degradationen durch 20S Proteasomen aus Herzen und Milzen waren mit denen der Prozessierung durch 20S Proteasomen aus T2 und T2.27mp Zellen weitgehend übereinstimmend. Qualitative Unterschiede in Abhängigkeit von der Infektion oder bei einem Vergleich des Produktspektrums beider Mausstämmen wurden nicht detektiert. Die Ergebnisse für das Polypeptid CVB3 Pol_[2158-2185] waren analog. Die quantitative Auswertung wurde zunächst für Degradationen durchgeführt, in denen isolierte 20S Proteasomen aus Herzen eingesetzt wurden.

20S Proteasomen aus Herzen

Die eingesetzten Polypeptide wurden durch 20S Proteasomen aus Herzen von C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen im Verlauf der CVB3 Infektion unterschiedlich schnell degradiert (Abb. 3-15). Die 20S Proteasomen, die aus Herzen von C57BL/6 Mäusen am Tag 4 nach Infektion isoliert wurden, degradierten die Substrate CVB3 VP2_[272-302] und CVB3 Pol_[2158-2185] am schnellsten (Abb. 3-15A+B links). Bei einer Verdauzeit von 7h war bei Proteasomen aus nicht-infizierten C57BL/6 Mäusen noch 62% des Polypeptidsubstrates CVB3 VP2_[272-302] vorhanden, bei Ansätzen mit Proteasomen vom Tag 4 lediglich 33%. 20S Proteasomen aus Herzen, die am Tag 8 nach Infektion entnommen wurden, zeigten eine ähnliche Abbaukinetik wie die der Kontrolltiere. Vergleicht man die Degradation des Substrates CVB3 Pol_[2158-2185] durch 20S Proteasomen aus C57BL/6 Mauser Herzen,

so war die höchste Degradationsrate ebenfalls am Tag 4 nach Infektion zu beobachten. Im Gegensatz dazu wiesen 20S Proteasomen aus Herzen von A.BY/SnJ Mäusen, unabhängig vom eingesetzten Substrat, die höchste Degradationsrate am Tag 8 nach Infektion auf (Abb. 3-15A+B rechts).

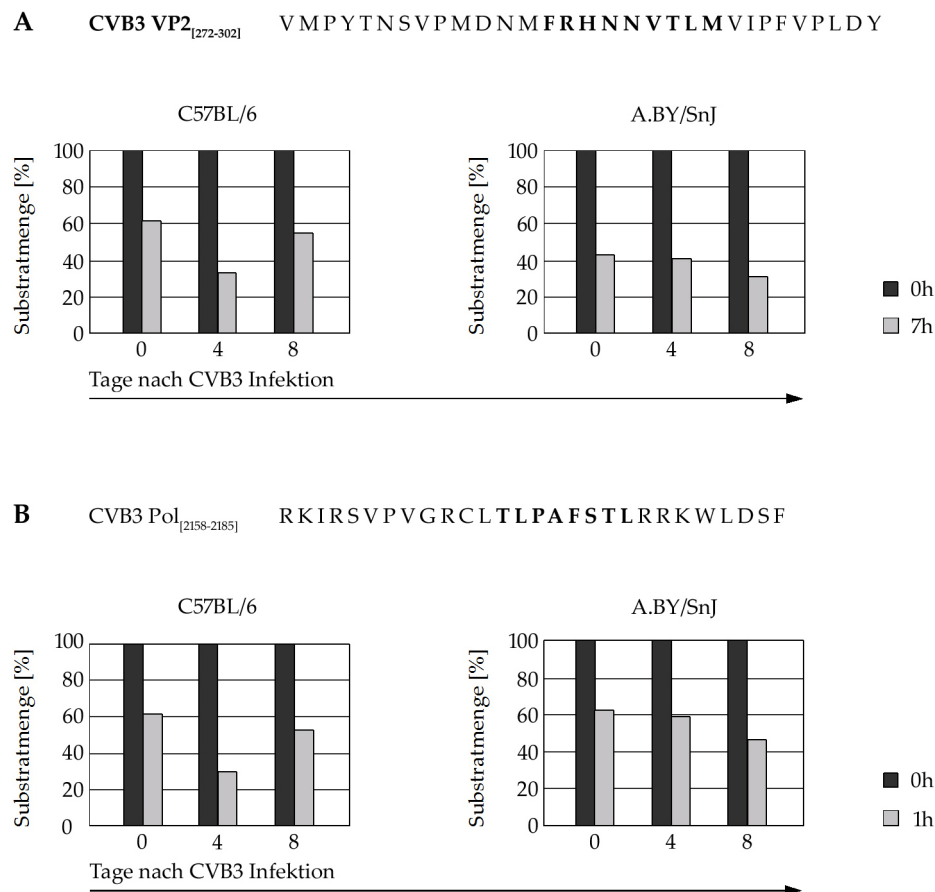


Abb. 3-15. Abbau synthetischer CVB3 Polypeptidsubstrate durch 20S Proteasomen aus Herzen nicht-infizierter und CVB3 infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse. Die eingesetzte Substratmenge wurde als 100% definiert, und die verbleibende Menge nach einer Degradationsdauer von 7h für das CVB3 VP2_[272-302] Substrat und von 1h für das CVB3 Pol_[2158-2185] Substrat berechnet. Die Stundenangaben der Legende beziehen sich auf die Degradationszeit: 0h bezeichnet die eingesetzte Substratmenge zu Beginn der Degradationsexperimente (in allen Diagrammen dunkelgrau), 7 bzw. 1h bezeichnen die Prozessierungsdauer (hellgrau). Die Zahlen 0, 4 und 8 der X-Achse geben den Zeitpunkt nach CVB3 Infektion wieder. 0 bezeichnet nicht-infizierte Tiere, 4 und 8 die Tage nach CVB3 Infektion. Dargestellt ist die Degradationskinetik eines Reaktionsansatzes aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Polypeptidsubstrate wurden durch die 20S Proteasomen am schnellsten degradiert, die jeweils den höchsten Anteil inkorporierter Immununtereinheiten aufwiesen. Diese Unterschiede zwischen C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen liessen Unterschiede in Generierung immunrelevanter Produkte vermuten. Die genauen Auswirkungen sollen im Folgenden näher charakterisiert werden.

CVB3 VP2_[272-302] V M P Y T N S V P M D N M F R H N N V T L M V I P F V P L D Y

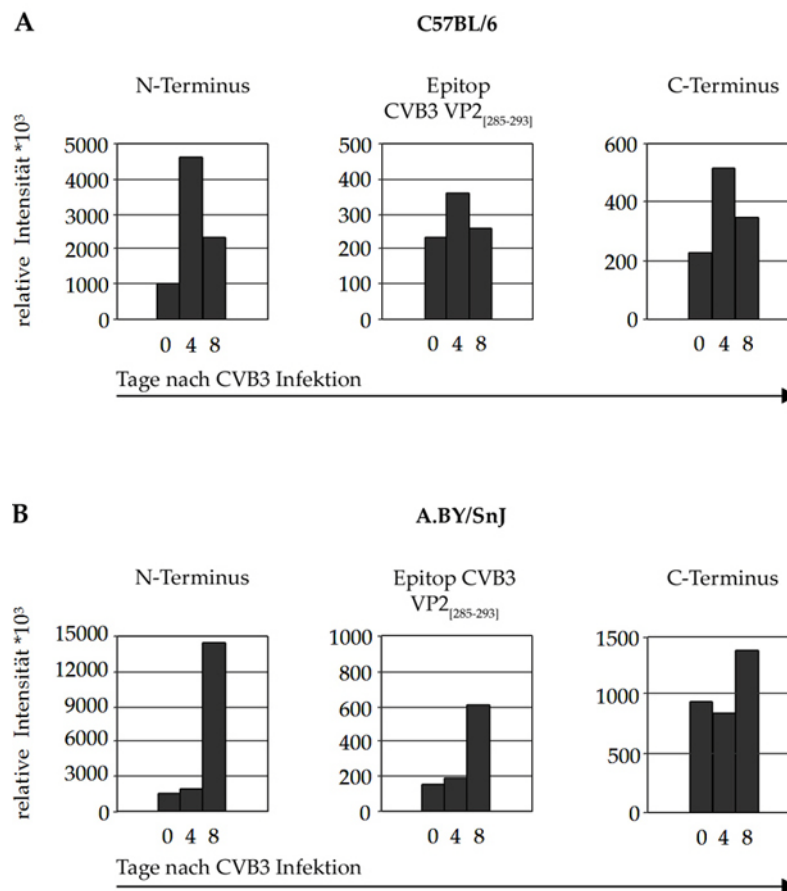


Abb. 3-16. Generierung immunrelevanter Fragmente aus dem Polypeptid CVB3 VP2_[272-302] durch 20S Proteasomen aus Herzen von C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen. Die Herzen wurden nicht-infizierten C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen und infizierten Tieren am Tag 4 und 8 nach CVB3 Infektion entnommen, 20S Proteasomen isoliert und mit dem Polypeptidsubstrat CVB3 VP2_[272-302] inkubiert. Dargestellt sind die relativen Intensitäten (*10³) der Produkte nach einer Prozessierungsdauer von 7h: Das Epitop CVB3 VP2_[285-293] und die flankierenden N- und C-Termini. Die Zahlen 0, 4 und 8 der X-Achse beziehen sich auf den Tag nach CVB3 Infektion, an dem die Organe entnommen wurden. Dargestellt ist das Ergebnis eines Degradationsexperimentes aus drei unabhängigen Versuchen.

Die aus C57BL/6 Mäusen isolierten 20S Proteasomen aus CVB3-infizierten Tieren generierten größere Mengen des H-2D^b-restringierten Epitops CVB3 VP2_[285-293] als 20S Proteasomen aus Herzen nicht-infizierter Tiere. Dieses Ergebnis war auch für die korrespondierenden N- und C-Termini zu beobachten (Abb. 3-16A). Die höchste Intensität wurde in Reaktionsansätzen mit 20S Proteasomen vom Tag 4 nach Infektion detektiert. 20S Proteasomen aus Herzen nicht-infizierter A.BY/SnJ Mäuse und aus Herzen, die am Tag 4 nach Infektion entnommen wurden, generierten vergleichbare Mengen immunrelevanter Fragmente aus dem Substrat CVB3 VP2_[272-302]. 20S Proteasomen, die aus Herzen stammen, die am Tag 8 entnommen wurden, generierten eine größere Menge dieser Produkte (Abb. 3-16B).

Ein entsprechendes Ergebnis wurde auch für das Substrat CVB3 Pol_[2158-2185] erzielt, das ein potentiell H-2K^b-restringiertes Epitop enthielt (Abb. 3-17). 20S Proteasomen, die aus Herzen von C57BL/6 Mäusen entnommen wurden, generierten die größte Menge des potentiellen Epitopvorläufers CVB3 Pol_[2168-2177] am Tag 4 nach CVB3 Infektion. Für 20S Proteasomen aus Herzen von A.BY/SnJ Mäusen wurde eine zeitliche Verschiebung zum Tag 8 nach CVB3 Infektion beobachtet.

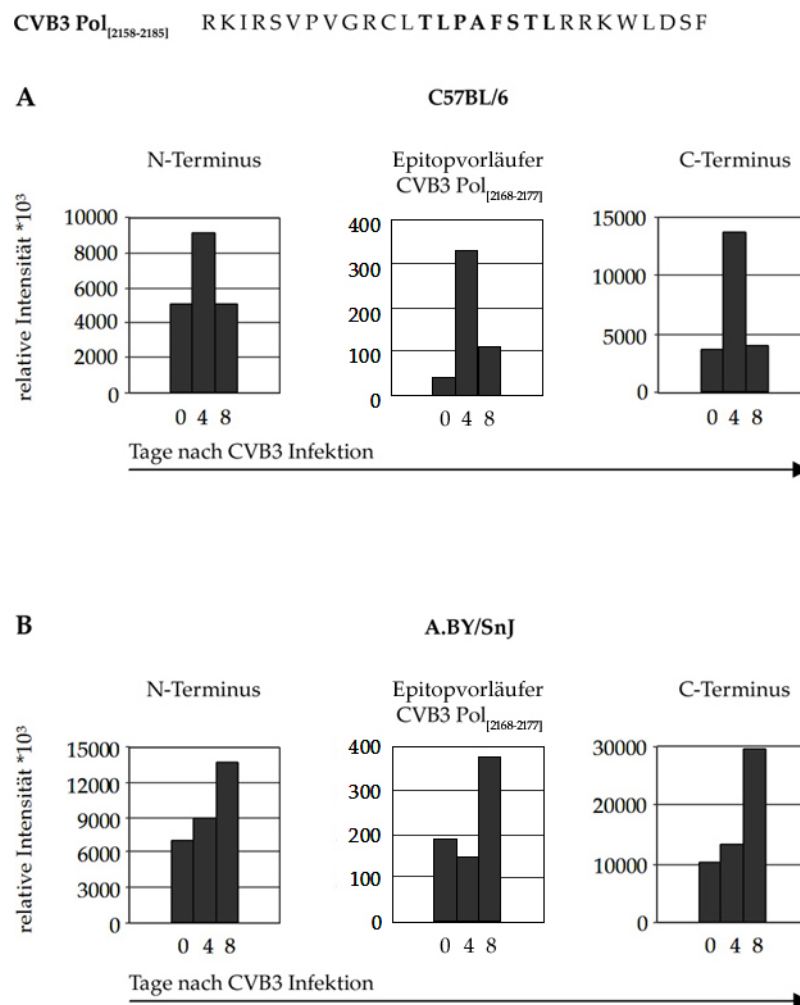


Abb. 3-17. Generierung immunrelevanter Fragmente aus dem Polypeptid CVB3 Pol_[2158-2185] durch 20S Proteasomen aus Herzen von C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen. Die Herzen wurden nicht-infizierten C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen und infizierten Tieren am Tag 4 und 8 nach CVB3 Infektion entnommen, 20S Proteasomen isoliert und mit dem Polypeptidsubstrat CVB3 Pol_[2158-2185] inkubiert. Dargestellt sind die relativen Intensitäten (*10³) der Degradationsprodukte nach einer Prozessierungsdauer von 1h. Abgebildet ist das Resultat eines Degradationsexperimentes aus drei unabhängigen Versuchen.

20S Proteasomen aus Milzen

20S Proteasomen, die aus Milzen nicht-infizierter und infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse isoliert wurden, wiesen jeweils ungefähr gleiche Degradationsraten auf. Die verbleibende Menge des Substrates CVB3 VP2_[272-302] betrug bei einer Prozessierungsdauer von 1,5h 60% für Proteasomen, die aus Milzen von C57BL/6 Mäusen isoliert wurden. Bei einer Prozessierung durch 20S Proteasomen aus Milzen von A.BY/SnJ Mäusen betrug die verbleibende Substratmenge nach 4h 40% (Abb. 3-18).

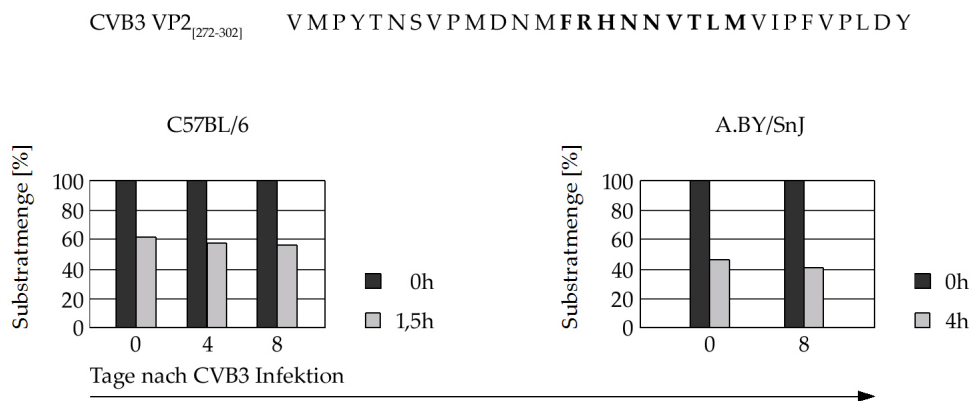


Abb. 3-18. Degradation des Substrates CVB3 VP2_[272-302] durch 20S Proteasomen aus Milzen nicht-infizierter und CVB3 infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse. Milzen wurden nicht-infizierten Tieren und am Tag 4 und 8 nach Infektion entnommen, 20S Proteasomen isoliert und *in vitro* Degradationsexperimente durchgeführt. Die eingesetzte Substratmenge wurde als 100% definiert und die jeweils verbleibende Menge berechnet. Für Degradationsexperimente mit 20S Proteasomen aus C57BL/6 Milzen wurde eine Degradationsdauer von 1,5h, für Experimente mit 20S Proteasomen aus A.BY/SnJ Milzen eine Dauer von 4h zugrunde gelegt. Dargestellt ist das Ergebnis eines Degradationsexperimentes aus zwei unabhängigen Versuchen.

Korrelierend mit der vergleichbaren Degradationsgeschwindigkeit variierten auch die Intensitäten der Produkte nicht in Abhängigkeit vom Infektionszeitpunkt: Bei gleicher Degradationsdauer konnten vergleichbare Intensitäten der generierten Produkte detektiert werden. Abb. 3-19 zeigt als Beispiel die Ergebnisse der Prozessierung des Substrates CVB3 Pol_[2158-2185]. Auch bei der Degradation des Substrates CVB3 VP2_[272-302] durch 20S Proteasomen, die aus Milzen nicht-infizierter und infizierter Mäuse isoliert wurden, waren bei gleicher Verdauzeit ähnliche Produktintensitäten zu beobachten (keine Abbildung).

CVB3 Pol_[2158-2185] RKIRSVPVGRCLTLPAFSTLRRKWLDSE

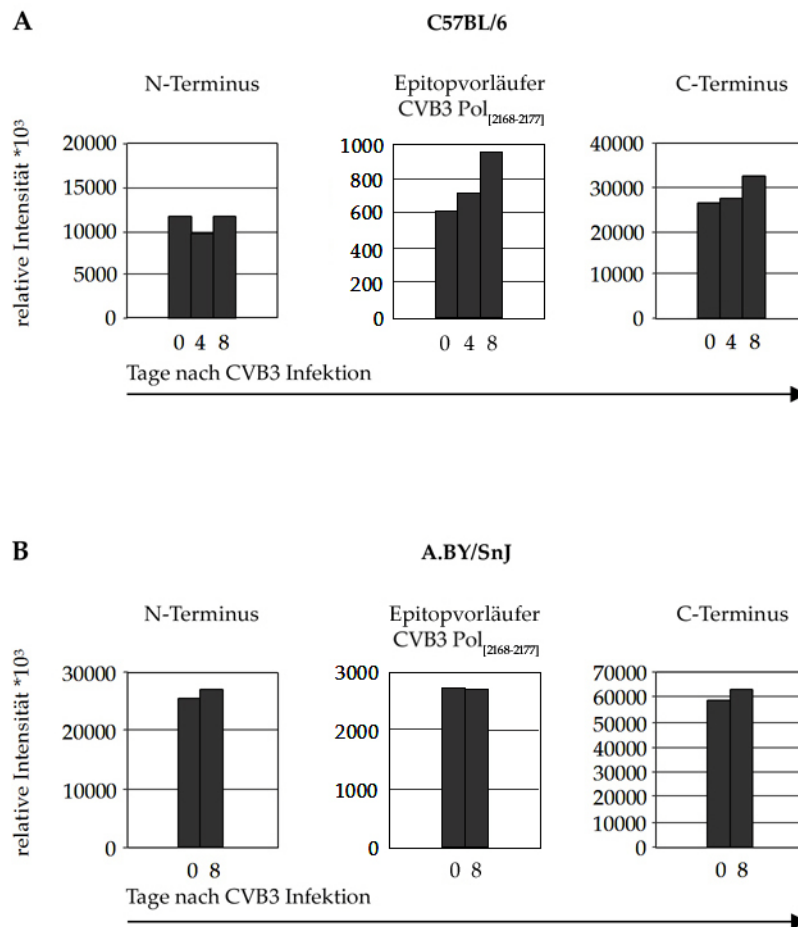


Abb. 3-19. Generierung immunrelevanter Fragmente aus dem Polypeptid CVB3 Pol_[2158-2185] durch 20S Proteasomen aus Milzen nicht-infizierter und infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse. Die isolierten 20S Proteasomen wurden mit dem Polypeptidsubstrat CVB3 Pol_[2158-2185] inkubiert und die Produkte massenspektrometrisch analysiert. Dargestellt sind die relativen Intensitäten (*10³) nach einer Degradationsdauer von 40min für den Epitopvorläufer CVB3 Pol_[2168-2177] und die flankierenden N- und C-Termini. Dargestellt ist das Ergebnis eines Degradationsexperimentes aus zwei unabhängigen Versuchen.

Eine Infektion mit CVB3 induziert die Expression der Immununtereinheiten in Herzen. In Abhängigkeit vom Anteil inkorporierter Immununtereinheiten in 20S Proteasomen, die aus Herzen isoliert wurden, wurde eine Veränderung der proteolytischen Aktivität verursacht. Die vergleichsweise spätere Induktion der Immununtereinheiten in A.BY/SnJ Mäusen führt zu einer späteren effizienten Generierung immunrelevanter Produkte. Die Zusammensetzung und die proteolytische Aktivität der 20S Proteasomen in Milzen änderten sich dagegen in beiden Mausstämmen nicht, und die proteolytische Aktivität war insgesamt höher als die von 20S Proteasomen aus Herzen.

3.4 Zusammensetzung von 20S Proteasomen und PA28 in Kardiomyozyten

3.4.1 Einfluss von Typ I und II IFN auf die Struktur von 20S Proteasomen

Mittels *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die zunehmende Menge der Immununtereinheiten nicht allein auf die Infiltration von Lymphozyten zurückzuführen ist, sondern dass diese ebenso in Kardiomyozyten exprimiert werden (Szalay 2006a). Die Produktion von IFN- β ist eine der ersten Reaktionen des Immunsystems auf eine virale Infektion, im weiteren Verlauf kommt es zur Produktion von IFN- γ (Pichlmair 2007). Für die Infektion mit Hepatitis C Virus wurde gezeigt, dass nicht nur Typ II IFN die Expression der Immununtereinheiten induzieren, sondern auch Typ I IFN (Shin 2006). Daher wurde untersucht, welchen Einfluss Typ I und II IFN auf die Zusammensetzung von 20S Proteasomen und auf die Expression von PA28 in den einzelnen Zelltypen des Myokards haben. Dazu wurden die Kardiomyozytenlinie HL-1, die Fibroblastenlinie C4 und die Makrophagenlinie Raw264.7 genutzt. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiträume mit je 50U/ml IFN- β oder IFN- γ behandelt. Die Expression proteasomaler Untereinheiten und von PA28 α und PA28 β wurde auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

Die Zellen wurde homogenisiert und die Expression sowohl von den proteasomalen Untereinheiten als auch von PA28 α und PA28 β analysiert. Abb. 3-20 zeigt repräsentativ die zeitabhängige Induktion der Untereinheit i β 5 für die Immununtereinheiten und von PA28 β durch IFN- γ und IFN- β . Entsprechende Ergebnisse wurden jeweils für die nicht gezeigten Immununtereinheiten und PA28 α erzielt. Abb. 3-20A zeigt die Analyse der Genexpression von i β 5 und PA28 α in HL-1 Zellen. Die Behandlung der Zellen mit IFN- β oder IFN- γ führt zu einer kontinuierlichen Zunahme von i β 5 und PA28 β Protein. Auch die Expression der MHC Klasse I schweren Kette wird durch Typ I und II IFN in HL-1 Zellen induziert (nicht gezeigt). In C4 Zellen wird die Expression von i β 5 und PA28 β ebenfalls durch IFN- β und IFN- γ induziert (Abb. 3-20B). In Raw264.7 Zellen ist die Proteinmenge an i β 5 und PA28 β nach IFN Behandlung unverändert (Abb. 3-20C). Diese Induktion der Expression in HL-1 und C4 Zellen wurde auch auf mRNA-Ebene beobachtet (nicht gezeigt).

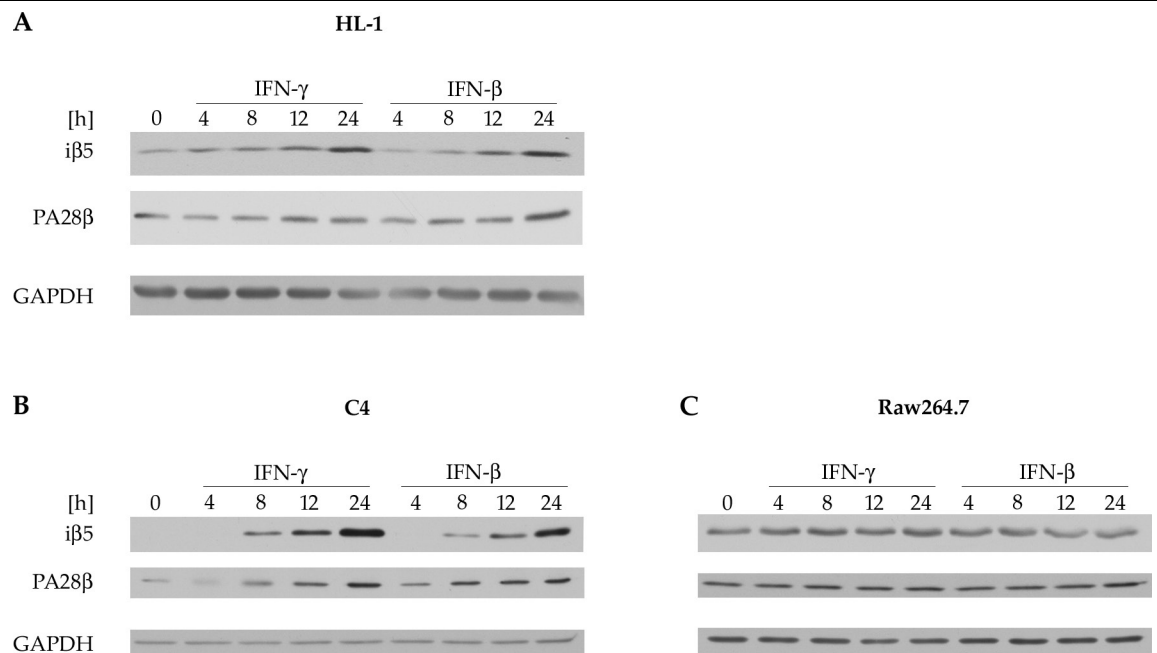


Abb. 3-20. Analyse der i β 5 und PA28 β Proteinmenge in Kardiomyozyten, Fibroblasten und Makrophagen. HL-1, C4 und Raw264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit IFN- γ oder IFN- β (50U/ml) stimuliert. Die Zellen wurden nach 4, 8, 12 und 24 Stunden geerntet und lysiert. Je 25 μ g Gesamtproteinextrakt wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen und unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion mit Antikörpern, die gegen i β 5, PA28 β und GAPDH gerichtet waren. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Western Blot Analysen der Gesamtproteinextrakte geben lediglich Hinweise auf die Zusammensetzung der 20S Proteasomen. Um freie von inkorporierten proteasomalen Untereinheiten unterscheiden zu können, wurden 20S Proteasomen aus Lysaten IFN stimulierter und unbehandelter HL-1 und Raw264.7 Zellen immunpräzipitiert. Repräsentativ für die Immununtereinheiten wurde i β 5 und für die Assoziation von PA28 die Untereinheit PA28 β in den folgenden Western Blot Analysen nachgewiesen. Die inkorporierte Menge an i β 5 im 20S *core* Partikel ist nach Behandlung der Kardiomyozyten mit IFN- γ oder IFN- β höher als in unbehandelten Zellen. Auch die Assoziation des Proteasomenaktivators mit dem 20S *core* Partikel nimmt in Kardiomyozyten nach IFN Stimulation zu (Abb. 3-21A). In Raw264.7 Zellen verändert sich die Zusammensetzung von 20S Proteasomen nicht (persönliche Mitteilung Melanie Rieger), aber die Assoziation von PA28 und 20S Proteasomen wird beeinflusst. Mit zunehmender Stimulationsdauer konnten mehr 20S Proteasomen präzipitiert werden, die mit PA28 assoziiert waren (Abb. 3-21B).

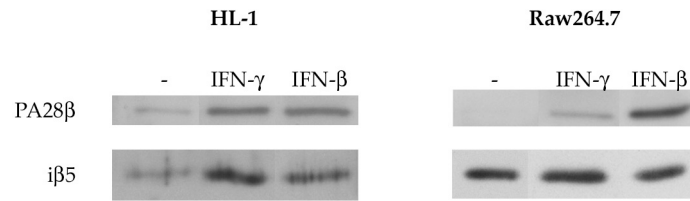


Abb. 3-21. Analyse immunpräzipitierter 20S Proteasomen aus HL-1 und Raw264.7 Zellen. HL-1 und Raw264.7 Zellen wurden 24 Stunden mit IFN- γ oder IFN- β stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach Zellernte wurden diese lysiert und 20S Proteasomen mit einem gegen die proteasomale Untereinheit $\beta 7$ gerichteten Antikörper (Mcp444) aus 100 μ g Gesamtproteinextrakt immunpräzipitiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Immunpräzipitate im Western Blot. Für die Detektion wurden Antikörper genutzt, die spezifisch für PA28 β und i $\beta 5$ waren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die proteasomalen Untereinheiten i $\beta 1$, i $\beta 2$ und i $\beta 5$ durch Typ I und II IFN in nicht-lymphatischen Zelllinien induziert wurden. Keine Induktion erfolgte in Zelllinien lymphatischen Ursprungs. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der 20S Proteasomen aus Herzen und Milzen nicht-infizierter und CVB3 infizierter Mäuse überein. Die Sekretion von Typ I und II IFN führte zu einer veränderten Zusammensetzung der 20S Proteasomen in Herzen. Diese Veränderungen wurden auch in Kardiomyozyten beobachtet und ermöglichen eine effiziente Antigenprozessierung nach einer CVB3 Infektion. Die Induktion der MHC Klasse I Moleküle in HL-1 Zellen deutet darauf hin, dass Kardiomyozyten zur Antigenpräsentation beitragen können, und so die Immunantwort gegen CVB3 beeinflussen.

3.4.2 Einfluss von poly (I:C) auf die Struktur von 20S Proteasomen

Die Induktion der Expression der Immununtereinheiten und der Untereinheiten von PA28 erfolgte durch exogene Stimulation mit IFN- γ oder IFN- β . Ferner sollte untersucht werden, ob die Expression der Immununtereinheiten in Kardiomyozyten durch virale RNA selbst ausgelöst werden kann. Dafür wurden HL-1 Zellen für verschiedene Zeiträume mit poly (I:C), einem synthetischen Analogon viraler dsRNA, behandelt. Die Detektion von dsRNA, einem Replikationsintermediat ssRNA Viren, oder von poly (I:C) durch TLR3 führt zu dessen Aktivierung und schließlich zur Phosphorylierung und Aktivierung des *interferon-regulatory factor 3* (IRF3). Nach Translokation von IRF3 in den Zellkern kommt es zur Transkription von Typ I IFN und weiterer *interferon stimulated genes* (ISG) (Honda 2006; Bowie 2005). IFN- β wird sezerniert und aktiviert nach Rezeptorbindung auto- und parakrin den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg, was wiederum die Transkription IFN regulierter Gene auslöst.

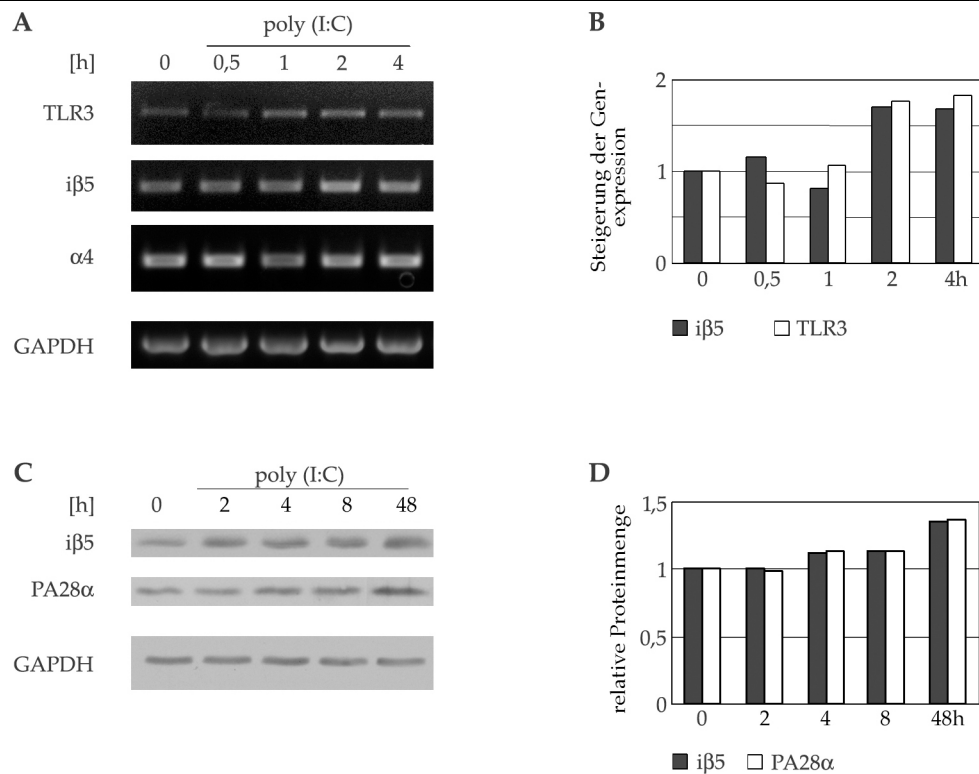


Abb. 3-22. Expression von $\alpha 4$, $i\beta 5$, PA28 α und TLR3 in HL-1 Zellen nach poly (I:C) Behandlung. HL-1 Zellen wurden für ½, 1, 2 oder 4 Stunden mit 20 μ g/ml poly (I:C) stimuliert oder unbehandelt belassen (0h). Es wurde Gesamt RNA isoliert und die Expression der Gene *Tlr3* (TLR3), *Psmb8* ($i\beta 5$), *Pma7* ($\alpha 4$) und *Gapdh* (GAPDH) mittels Reverse Transkriptase PCR analysiert (A). Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ. Die Genexpression ist als Steigerung gegenüber der mRNA-Menge unbehandelter Zellen angegeben. Die X-Achse gibt die Stimulationsdauer in Stunden [h] mit poly (I:C) wieder (B). Für die Analyse der Proteinmenge wurden je 12,5 μ g Gesamtproteinextrakt unter denaturierenden Bedingungen in der Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt und anschließend im Immunoblot analysiert. Dafür wurden Antikörper, die spezifisch für $i\beta 5$ und PA28 α waren, eingesetzt. GAPDH diente als Ladekontrolle (C). Die densitometrische Auswertung erfolgte ebenfalls mit dem Programm ImageJ und gibt die Proteinmenge relativ zur Menge unbehandelter HL-1 Zellen an (D).

HL-1 Zellen wurden für ½, 1, 2 oder 4h mit 20 μ g/ml poly (I:C) inkubiert und anschließend wurde in Abhängigkeit von der Fragestellung entweder RNA isoliert oder für die Analyse auf Proteinebene wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt. Nach Behandlung von HL-1 Zellen mit poly (I:C) steigt die Menge an TLR3-mRNA. Auch eine Induktion der $i\beta 5$ -mRNA war nach zwei Stunden zu beobachten. Die mRNA-Menge von $\alpha 4$ ist unverändert (Abb. 3-22A+B). Das Ergebnis auf Proteinebene korreliert mit dem der mRNA-Ebene. Eine schwache Induktion der $i\beta 5$ Proteinmenge ist nach poly (I:C) Stimulation zu beobachten. Auch die Menge an PA28 α Protein steigt (Abb. 3-22C+D). Die Induktion der Expression der Immununtereinheiten und von PA28 α und PA28 β durch poly (I:C) ist schwach, konnte aber in unabhängigen Stimulationsreihen der HL-1 Zellen mit poly (I:C) reproduziert werden.

Die Expression der Immununtereinheiten wird damit nicht nur durch exogenes IFN- γ und IFN- β induziert, sondern möglicherweise auch durch endogen synthetisiertes IFN nach poly (I:C) Stimulation.

3.5 Bestimmung der Immunrelevanz potentieller CVB3 Epitope

3.5.1 MHC Klasse I Bindung und Stabilisierung

Voraussetzung für Erkennung und Eliminierung virusinfizierter Zellen ist die MHC Klasse I-restringierte Präsentation der CVB3 Epitope auf der Zelloberfläche. Zwischen Bindungs- und Stabilisierungskapazität der Peptide und deren Immunogenität besteht ein enger Zusammenhang (Sette 1994; van der Burg 1996). Daher wurden zunächst die Bindungsstärke und die Stabilität der MHC-Peptid-Komplexe überprüft.

Für die Charakterisierung der Bindungsaffinität wurden RMA-S Zellen über Nacht mit verschiedenen Peptidkonzentrationen inkubiert und die Menge der MHC-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch analysiert. Ein Maß für die Bindungsstärke ist die Relative Affinität (RA). Sie ist definiert als die Peptidkonzentration, die notwendig ist, um 20% der maximalen Stabilisierung durch Referenzpeptide zu erreichen. Referenzpeptide sind bekannte, stark bindende Peptide. Das Peptid LCMV NP_[396-404] wurde als H-2D^b Positivkontrollpeptid eingesetzt, OVA_[257-264] wurde als H-2K^b Referenz genutzt. Trotz hoher Scoringwerte des Vorhersagealgorithmus war die Affinität der einzelnen Peptide sehr unterschiedlich. Für die zu testenden Peptide ergaben sich Konzentrationen im Bereich von 1 bis 15 μ M, die notwendig waren, um 20% der Maximalbindung zu erreichen. Daraus liessen sich Relative Affinitäten von 1 bis 512 berechnen. Die geringe Affinität des oktameren Peptids CVB3 VP2_[285-292] ist auf dessen Länge zurückzuführen (Abb. 3-23; Tab. 3-4).

Die Halbwertszeit (DC₅₀) der MHC Klasse I-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche gibt die Stabilität der Bindung der Peptide an. Die Halbwertszeiten der eingesetzten Peptide lagen zwischen weniger als einer Stunde und sechs Stunden, die Positivkontrollpeptide wiesen eine Halbwertszeit auf der Zelloberfläche von acht Stunden auf (Tab. 3-4).

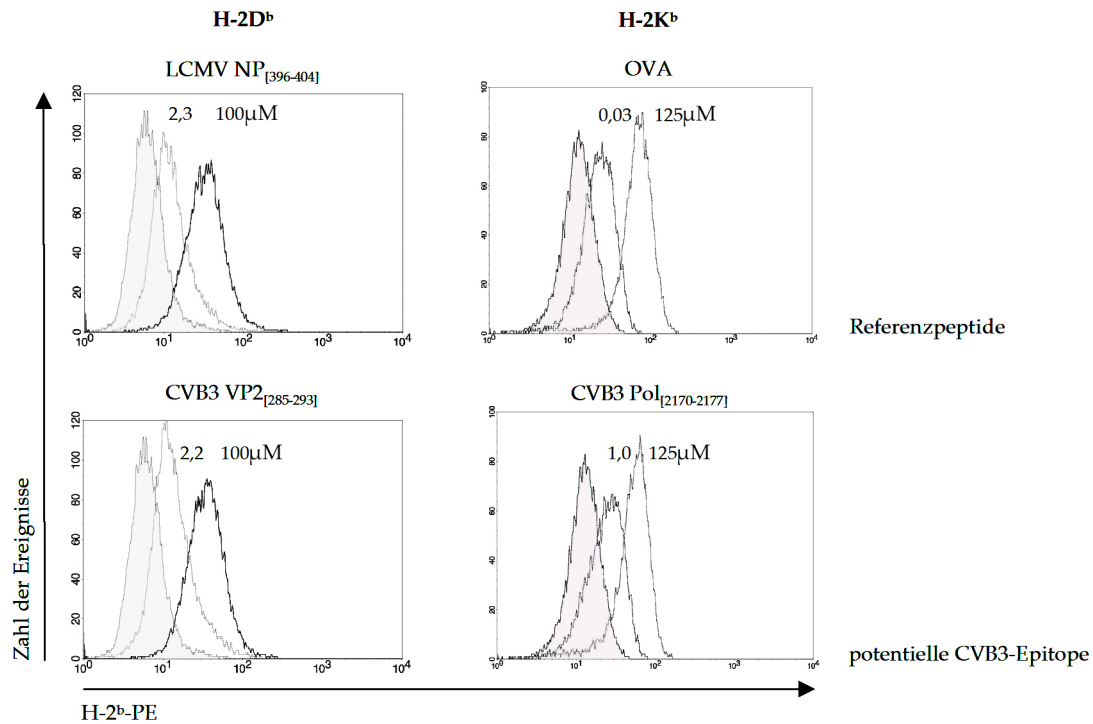


Abb. 3-23. Durchflusszytometrische Analyse der MHC Klasse I-Peptid-Komplexe in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration. Dargestellt sind die Histogramme der FACS-Analyse zur Bestimmung der Bindungsaffinität. RMA-S Zellen wurden über Nacht mit verschiedenen Peptidkonzentrationen inkubiert, danach mit Phycoerythrin-gekoppelten Antikörpern (H-2^b-PE), die entweder gegen H-2D^b- oder H-2K^b-Moleküle gerichtet waren, gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Peptide LCMV NP_[396-404] und OVA wurden als Positivkontrollpeptide für die H-2D^b- oder H-2K^b-Affinität genutzt. Als Beispiel für die zu testenden Peptide aus CVB3 sind die Histogramme der potentiellen Epitope CVB3 VP2_[285-293] und CVB3 Pol_[2170-2177] für zwei verschiedene Peptidkonzentrationen dargestellt. In den Histogrammen angegeben sind die Peptidkonzentrationen [μM], die für eine maximale Stabilisierung notwendig waren, und die Konzentrationen, die erforderlich waren, um 20% der Maximalbindung durch die Positivkontrollpeptide zu erreichen. 100μM des H-2D^b-restringierten Positivkontrollpeptides LCMV NP_[396-404] waren nötig, um eine maximale Stabilisierung zu erreichen, und 125μM des H-2K^b-restringierten Referenzpeptides OVA_[257-264] waren erforderlich. Die Konzentrationen für 20% der maximalen Stabilisierung betrugen 2,2 bzw. 1,0μM für die zu testenden Peptide. Zellen, die ohne Peptid, aber mit Antikörpern inkubiert wurden, sind grau schattiert.

Auf der Basis von Relativer Affinität und Stabilität können die getesteten Peptide in verschiedene Klassen eingeteilt werden: Hochaffine Peptide ($RA > 10$, $DC_{50} > 2h$), Peptide, die mit mittlerer Kapazität binden ($RA > 10$, $DC_{50} > 2h$) und nicht-affine Peptide ($DC_{50} < 2h$) (Tourdot 2000). Die Affinität und Stabilität der Bindung korrelieren. Peptide, die eine hohe Stabilität gewährleisten, binden in der Regel auch mit hoher Affinität. Als hochaffine Peptide können die Peptide CVB3 VP2_[285-293] und CVB3 VP2_[273-281] bezeichnet werden, wobei letzteres nicht durch 20S Proteasomen generiert wurde. Man geht davon aus, dass die Immunogenität der Peptide primär von der Stabilität der Bindung abhängt. Peptide, die weniger als 2h binden, sind selten immunogen, unabhängig von ihrer Affinität (Tourdot 2000). Die potentiellen Epitope CVB3 VP2_[284-292], CVB3 3C_[1561-1568] und CVB3 Pol_[2170-2177] und das Oktamer CVB3 VP2_[285-292] gehören damit zu der Gruppe der nicht-affinen Peptide.

Tab. 3-4. Affinität und Stabilität der Bindung der potentiellen H-2^b-restringierten Epitope. Die Affinität bezeichnet die Stabilisierung in Abhängigkeit von der Konzentration und ist definiert als diejenige Konzentration, die notwendig ist, um 20% der maximal auf der Zelloberfläche stabilisierten MHC Klasse I Moleküle durch die Positivkontrollpeptide zu erreichen. Die Relative Affinität (RA) ist definiert als das Verhältnis der Konzentrationen von zu testendem Peptid zu Referenzpeptid, die jeweils 20% der Maximalbindung durch das Referenzpeptid erreichen. Die Stabilität wird in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Maßgeblich ist die Zeit, bei der 50% der maximalen Menge auf der Zelloberfläche stabilisiert werden. Der MHC Score bezeichnet die Scoringwerte der SYFPEITHI Vorhersage der CVB3 Epitope. OVA_[257-264] und LCMV NP_[396-404] dienten als Referenzpeptide, von denen eine Bindung mit hoher Affinität und Stabilität bekannt ist. * Oktamer CVB3 VP2_[285-292] der überlappenden potentiellen Epitope CVB3 VP2_[284-292] und CVB3 VP2_[285-293], dem kein MHC Score zugeordnet war.

Peptid	MHC Score	Affinität [µM]	RA	Stabilität [h]
CVB3 VP2 _[285-293]	25	2,2	1	6
CVB3 VP2 _[273-281]	22	2,4	1	2
CVB3 VP2 _[284-292]	21	22	10	<1
CVB3 Pol _[2170-2177]	23	1,0	32	<1
CVB3 3C _[1561-1568]	22	15	512	<1
CVB3 VP2 _[285-292]	*	50	22	<1
OVA _[257-264]		0,03		8
LCMV NP _[396-404]		2,3		8

3.5.2 Proliferationstest

Ein wichtiger *in vitro* Parameter für die Aktivierung von T Zellen *in vivo* ist die Proliferation der Zellen. Für eine erste Überprüfung der Immunogenität der potentiellen Epitope wurde die antigenabhängige Proliferation von Lymphozyten bestimmt. C57BL/6 Mäuse wurden mit CVB3 infiziert und die Milzen am Tag 8 nach Infektion nach Tötung der Tiere entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Milzzellen wurden mit verschiedenen Peptidkonzentrationen inkubiert, wobei für diese Versuche jeweils Gemische aus drei Peptiden eingesetzt wurden. Für eine Proliferationskontrolle wurden die Zellen mit Enterotoxin B aus *S. aureus* inkubiert. Die Messung der Proliferation erfolgte durch den Einbau von Tritium-markiertem Thymidin in die neu synthetisierte DNA.

Das Peptidgemisch 1 enthielt die H-2D^b-restringierten potentiellen Epitope CVB3 VP2_[284-292], CVB3 VP2_[285-293] und CVB3 VP2_[273-281]. Die potentiellen H-2K^b-restringierten Epitope CVB3 Pol_[2170-2177] und CVB3 3C_[1561-1568] waren Bestandteile des Peptidgemischs 2. Gegenüber der Proliferation unbehandelter Milzzellen war nach Inkubation mit dem Peptidgemisch 1 eine Steigerung der Proliferation um den Faktor 1,5 zu beobachten, für das Peptidgemisch 2 war eine

2,5fache Erhöhung der Proliferation zu verzeichnen. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte in beiden Fällen nicht beobachtet werden (Abb. 3-24A). Bei magnetisch separierten CD8⁺ T Zellen aus den Milzzellsuspensionen wurde eine 1,5fache Erhöhung der Proliferationsrate unabhängig von den jeweils eingesetzten Peptidgemischen beobachtet (Abb. 3-24B).

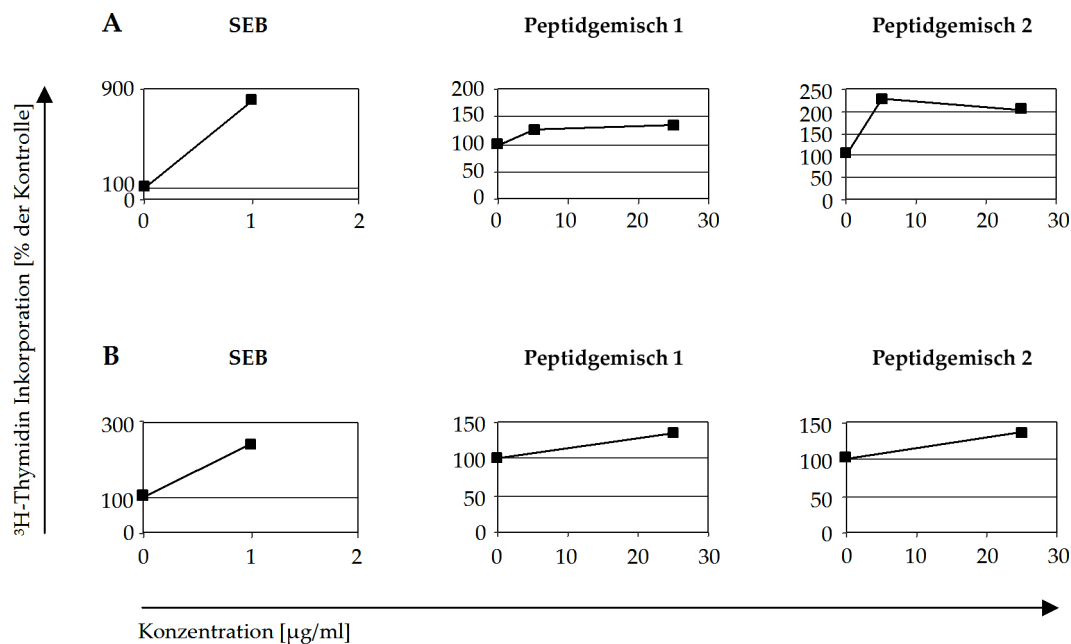


Abb. 3-24. Bestimmung der Proliferationsrate von Milzzellen aus CVB3 infizierten C57BL/6 Mäusen nach Stimulation mit Peptidgemischen durch Messung der Inkorporation von Tritium-markiertem Thymidin. Milzzellsuspensionen (A) oder aus Milzzellsuspensionen magnetisch separierte CD8⁺ T Zellen (B) wurden mit den Peptidgemischen 1 und 2 inkubiert. 12h vor Ende der Gesamtinkubationsdauer von 72h wurde jeweils 1µCi Tritium-markiertes Thymidin hinzugegeben. Die Messung erfolgte am Szintillationszähler. Die Peptide wurden jeweils in Konzentrationen von 5 und 25µg/ml als Peptidgemische, Enterotoxin B aus *S. aureus* (SEB) in einer Konzentration von 1µg/ml eingesetzt. Ausgehend von der Proliferation un behandelter Zellen (100%) wurden die Proliferationsraten für die zu testenden Peptide und für Enterotoxin B berechnet.

Zur Überprüfung der Fähigkeit einzelner Peptide, eine antigenspezifische Proliferation auszulösen, wurden Milzzellen CVB3 infizierter C57BL/6 Mäuse mit den Peptiden CVB3 VP2_[285-293], CVB3 VP2_[285-292] und CVB3 Pol_[2170-2177] inkubiert und die Proliferationsrate wiederum durch die Inkorporation von Tritium-markiertem Thymidin in die DNA bestimmt. Aufgrund der schwachen Stimulation der Proliferation bei der Inkubation mit den Peptidgemischen wurden auch Milzzellsuspensionen aus naiven C57BL/6 Mäusen mit Peptiden inkubiert und die Proliferation bestimmt. Damit sollte eine unspezifische Aktivierung der Zellen ausgeschlossen werden (Abb. 3-25).

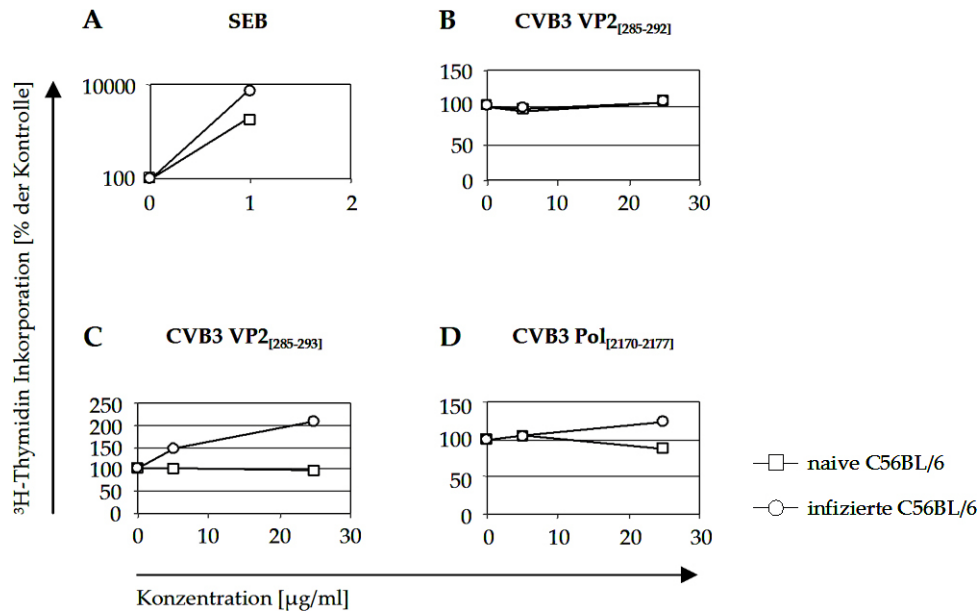


Abb. 3-25. Bestimmung der Proliferationsrate von Milzzellen nach Stimulation mit CVB3 Peptiden. Milzen wurden naiven und CVB3 infizierten C57BL/6 Mäusen entnommen und Milzellsuspensionen hergestellt. Diese wurden mit Peptid oder Enterotoxin B aus *S. aureus* für insgesamt 72h inkubiert. Die Zugabe von Tritium-markiertem Thymidin erfolgte 18h vor Ende der Gesamtinkubationsdauer. Die Peptide CVB3 VP2_[285-292] (B), CVB3 VP2_[285-293] (C) und CVB3 Pol_[2170-2177] (D) wurden in Konzentrationen von 5 oder 25 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, Enterotoxin B aus *S. aureus* in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ (A).

Das Oktamer CVB3 VP2_[285-292], das *in vitro* keine Stabilisierung der MHC Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche erreichte, war nicht in der Lage, eine antigenabhängige Proliferation der Milzzellen auszulösen. Die Proliferationsraten von Zellen aus naiven und infizierten C57BL/6 Mäusen unterscheiden sich nicht (Abb. 3-25B). Für CVB3 VP2_[285-293] konnte eine konzentrationsabhängige Stimulation zur Proliferation gezeigt werden, die bei Milzzellen aus nicht-infizierten Tieren nicht zu beobachten war (Abb. 3-25C). Auch das potentielle Epitop CVB3 Pol_[2170-2177] zeigte trotz seiner geringen Stabilisierungskapazität eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Proliferation der Milzzellen infizierter Tiere. Die Proliferationsrate lag allerdings nur schwach über der von Milzzellen gesunder Mäuse (Abb. 3-25D).

Die Ergebnisse der Proliferationsbestimmung korrelieren mit den Bindungsdaten der durchflusszytometrischen Analyse. Das nicht-affine Oktamer CVB3 VP2_[285-292] löst keine peptidabhängige Proliferation aus. Die Inkubation mit dem hoch-affinen potentiellen Epitop CVB3 VP2_[285-293] führt zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Proliferation von Milzzellen. Das Peptid CVB3 Pol_[2170-2177] wies eine hohe Affinität und eine geringe Stabilisierungskapazität auf, und löste eine schwache peptidabhängige Proliferation aus.

3.5.3 Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer T Zellen

Die Induktion der Proliferation von CD8⁺ T Zellen nach Stimulation mit den Peptidgemischen und die Induktion der Proliferation der Milzzellen nach Inkubation mit den einzelnen Peptiden liess vermuten, dass die Peptide Epitope spezifischer T Zellen waren. Die Bestimmung der Stimulation der Proliferation ermöglichte jedoch keine Aussage über die Frequenz antigenspezifischer CD8⁺ T Zellen. Daher wurde die IFN- γ -Produktion durch CD8⁺ T Effektorzellen als Antwort auf die Stimulation mit Peptiden durchflusszytometrisch bestimmt. C57BL/6 Mäuse wurden mit 1x10⁵ PFU CVB3 infiziert und die Milzen am Tag 8 nach Infektion entnommen. Die Zellsuspensionen wurden mit 0,5 oder 5 μ M Peptid inkubiert. Als Positivkontrolle wurde PMA/Ionomycin verwendet. Die Inkubation mit Peptid oder PMA/Ionomycin erfolgte in Gegenwart von Brefeldin A, um eine Sekretion des produzierten IFN- γ zu verhindern.

Abb. 3-26 zeigt die Dot-Plot-Darstellungen der durchflusszytometrischen Analyse. Nach Stimulation der Milzzellen infizierter Tiere mit dem oktameren Peptid CVB3 VP2_[285-292] war keine IFN- γ -Sekretion messbar (Abb. 3-26A+B). Auch bei Stimulation der Zellen mit CVB3 Pol_[2170-2177] konnte keine IFN- γ -Sekretion detektiert werden (Abb. 3-26D). Wurde das potentielle Epitop CVB3 Pol_[285-293] für die Stimulation eingesetzt, so betrug bei einer Konzentration von 5 μ M Peptid der Anteil IFN- γ und CD8a⁺ positiver Zellen 1,54%, bei einer Konzentration von 0,5 μ M war keine IFN- γ -Sekretion messbar. Die IFN- γ -Sekretion ist damit abhängig von der Konzentration des Peptids (Abb. 3-26C).

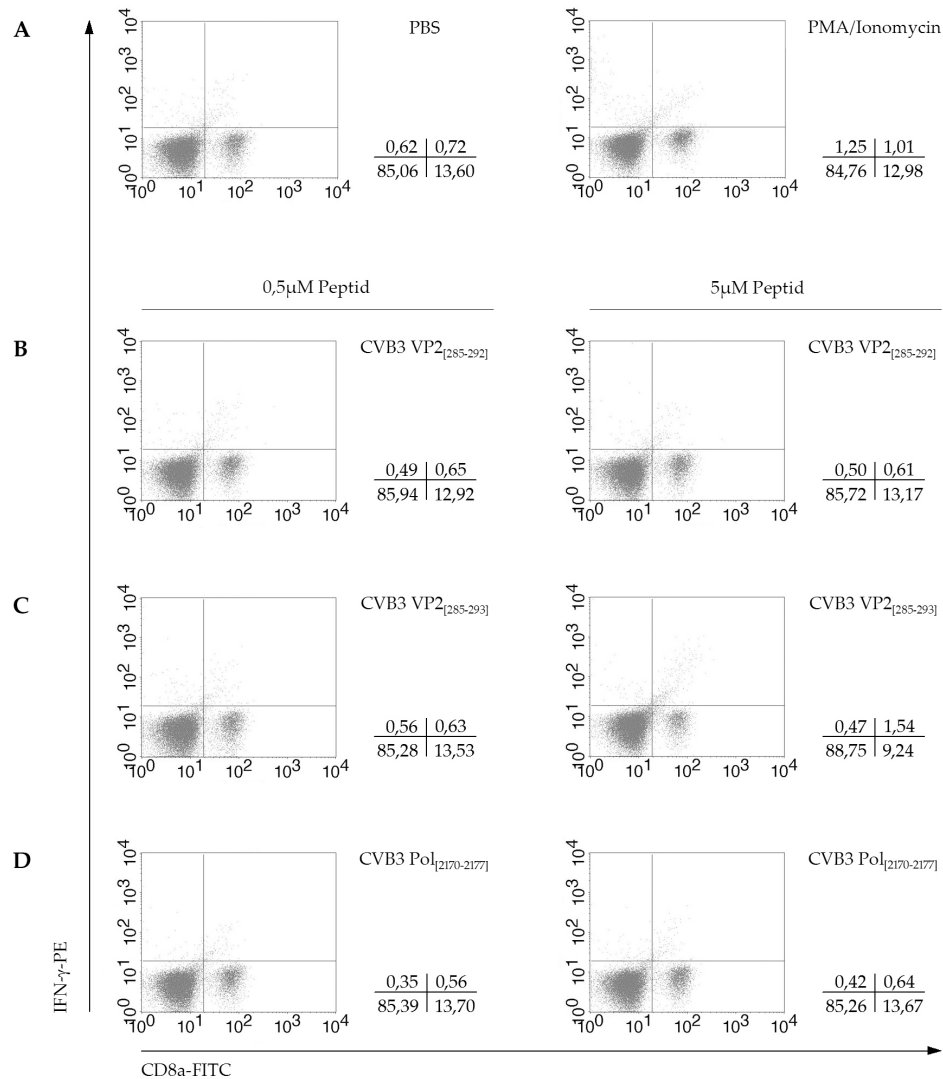


Abb. 3-26. IFN- γ -Sekretion durch CD8⁺ T Zellen nach Inkubation von Milzzellen aus CVB3 infizierten C57BL/6 Mäusen mit Peptiden. C57BL/6 Mäuse wurden mit 1×10^5 PFU infiziert und am Tag 8 nach Infektion getötet. Die Milzen wurden entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Inkubation der Milzzellsuspension mit 0,5 oder 5 μ M Peptid oder 5 ng/ml PMA und 10 μ g/ μ l Ionomycin erfolgte für insgesamt 10h. 6h vor Ende der Gesamtinkubationsdauer wurde BFA hinzugegeben, um die Sekretion von IFN- γ zu verhindern. Die Zellen wurden danach zunächst mit einem FITC-gekoppelten CD8a-spezifischen Antikörper inkubiert, anschließend mit einem PE-konjugierten Antikörper, der gegen IFN- γ gerichtet war. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer. Gezeigt sind die Dot-Plot-Darstellungen für unbehandelte Zellen (PBS) und die Positivkontrolle mit PMA/Ionomycin (A), und für Zellen die mit den Peptiden CVB3 VP2_[285-292] (B), CVB3 VP2_[285-293] (C) oder CVB3 Pol_[2170-2177] (D) inkubiert wurden. Rechts neben den Dot-Plot-Darstellungen sind die Quadrantenstatistiken [%] angegeben.

Da die Positivkontrolle mit PMA/Ionomycin sehr schwach ausfiel, und um eine unspezifische Aktivierung der CD8⁺ T Zellen durch die Peptide auszuschließen, wurden auch Milzzellen naiver C57BL/6 Mäuse mit verschiedenen Peptidkonzentrationen inkubiert. In keiner der untersuchten Proben konnte eine IFN- γ -Sekretion festgestellt werden (Abb. 3-27).

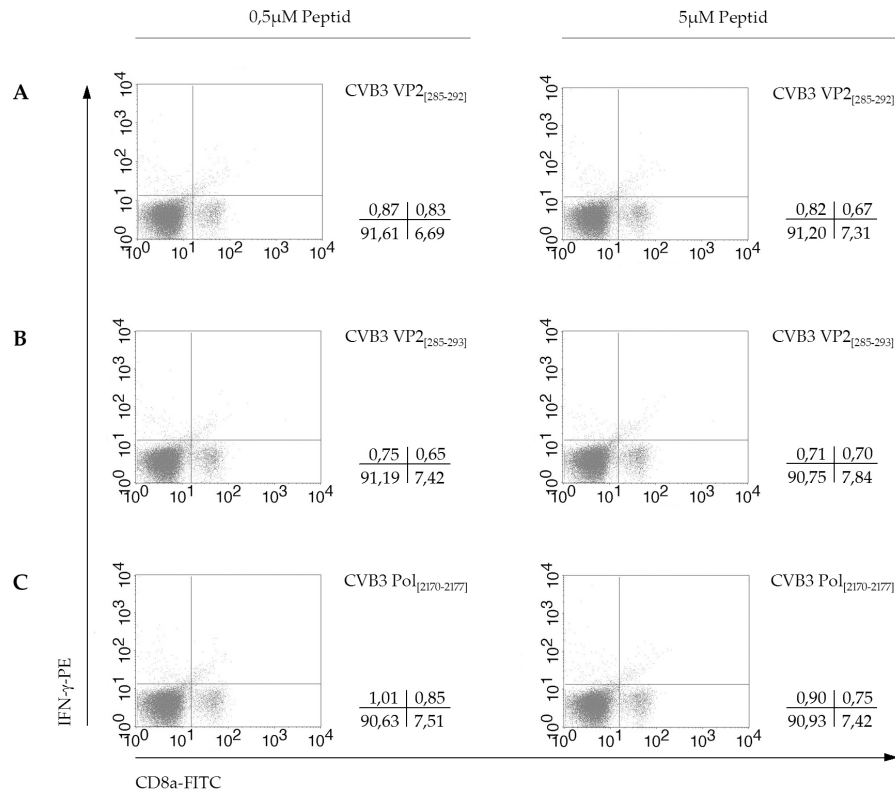


Abb. 3-27. IFN- γ -Sekretion durch CD8⁺ T Zellen naiver C57BL/6 Mäuse nach Inkubation mit CVB3 Peptiden. Aus den Milzen naiver C57BL/6 Mäuse wurden nach Organentnahme Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Inkubation der Milzzellsuspensionen mit 0,5 oder 5 μ M der Peptide CVB3 VP2_[285-292] (A), CVB3 VP2_[285-293] (B) oder CVB3 Pol_[2170-2177] (C) erfolgte für insgesamt 10h, 6h vor Ende der Gesamtinkubationsdauer wurde BFA hinzugegeben. Die Zellen wurden zunächst gegen CD8a (FITC) und anschließend gegen IFN- γ (PE) gefärbt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer. Rechts neben den Dot-Plot-Darstellungen sind die Quadrantenstatistiken [%] gezeigt.

Trotz der insgesamt eher schwachen Induktion der Proliferation und des geringen Anteils IFN- γ -sezernierender CD8⁺ T Zellen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Peptid CVB3 VP2_[285-293] um ein Epitop handelt, dass *in vivo* generiert und präsentiert wird. Das Peptid CVB3 VP2_[285-293] hat mit hoher Affinität an MHC Klasse I Moleküle gebunden, und die MHC-Peptid-Komplexe wiesen eine hohe Stabilität auf der Zelloberfläche auf. Ferner wurde eine peptidspezifische Proliferation von Milzzellen und die Sekretion von IFN- γ durch CD8⁺ T Zellen ausgelöst. Für Milzzellen naiver C57BL/6 Mäuse konnte kein positives Signal detektiert werden, so dass von einer antigenspezifischen Antwort auszugehen ist.

4 Diskussion

4.1 Die Identifikation H-2^b-restringierter CVB3 Epitope

4.1.1 Bindungseigenschaften vorhergesagter H-2^b-restringierter CVB3 Epitope

Akute virale Infektionen rufen die Aktivierung und Expansion von CD8⁺ T Zellen hervor. Solche zellulären Immunantworten können *ex vivo* detektiert und zur Identifikation MHC Klasse I restringierter Epitope genutzt werden. Obwohl die Rolle von CD8⁺ T Zellen in vielen Untersuchungen nachgewiesen wurde, konnten bisher keine CVB3 Epitope identifiziert werden, die zur Aktivierung von CD8⁺ T Zellen führen. CD8⁺ T Zellen sind in den zellulären Infiltraten der Herzen CVB3 infizierter Mäuse zu finden, und die Depletion von CD8⁺ T Zellen führt zu einem erhöhten CVB3 Virustiter (Klingel 1992; Henke 1995). Ferner konnte mit β_2 Mikroglobulin defizienten C57BL/6 Mäusen gezeigt werden, dass eine mangelnde MHC Klasse I restringierte Antigenpräsentation für die Entwicklung einer chronischen Myokarditis ursächlich sein kann (Klingel 2003). Bereits frühere Arbeiten untersuchten CVB3 epitopspezifische CD8⁺ T Zellen, führten aber nicht zur Identifikation von MHC Klasse I restringierten Epitopen (Slifka 2001; Kemball 2008). Eine Zellproliferation konnte *in vitro* durch synthetische Polypeptide aus der Aminosäuresequenz des CVB3 Capsidproteins VP1 ausgelöst werden. Jedoch wurden weder antigene Determinanten identifiziert, noch wurde der Phänotyp der proliferierenden T Zellen bestimmt (Huber 1993).

Zur Identifikation von T Zellepitopen definierter Restriktion wurden Algorithmen zur Bindungsvorhersage von Peptiden an MHC Klasse I Moleküle entwickelt. Eine zuverlässige Vorhersage potentieller CVB3 Epitope kann zur Identifikation relevanter immundominanter oder subdominanter Epitope führen, und damit die Analyse pathogener Mechanismen der CVB3 induzierten Myokarditis ermöglichen. In den vergangenen Jahren ist eine Vielzahl solcher Vorhersageprogramme entwickelt worden. Dabei geht man davon aus, dass mit steigender Affinität von Peptid und MHC Klasse I Molekül die Wahrscheinlichkeit der Präsentation auf der Zelloberfläche steigt (Rammensee 1999). Frühere Studien zeigten eine hohe Genauigkeit der Bindungsvorhersagen (Elkington 2003; Moutaftsi 2006). Bei der Identifikation H-2^b-restringierter Vaccinia Virus Epitope konnte zwar kein überdurchschnittlich dominantes Epitop identifiziert werden, aber eine Hierarchie der Präsentation war deutlich (Moutaftsi 2006).

Die ausgewählten vorhergesagten CVB3 Epitope wurden synthetisiert, und zunächst auf ihre Bindungseigenschaften überprüft. Die *in vitro* Analysen haben gezeigt, dass die Stabilität der

Bindung in der Regel mit der Affinität der Bindung von Peptid und MHC Klasse I Molekülen korreliert. Die CVB3 Peptide, die mit hoher Affinität gebunden haben, waren in der Lage, die MHC Klasse I Moleküle mehr als zwei Stunden auf der Zelloberfläche zu stabilisieren.

MHC Klasse I Affinität und Stabilität wiederum korrelieren mit der Immunogenität der Peptide: 90% der immunogenen Peptide binden mit hoher Affinität an MHC Klasse I Moleküle (Sette 1994). Eine Stabilisierung der Peptid-MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche von weniger als zwei Stunden, unabhängig von der Affinität von Peptid und MHC Klasse I Molekül, ist wahrscheinlich nicht immunogen (Tourdot 2000; van der Burg 1996). Die Aktivierung von naiven T Zellen benötigt zwar nur eine relativ kurze Exposition des Antigens, dennoch wird eine Dauer von wenigstens zwei Stunden angenommen. Die darauffolgende Expansion und Differenzierung kann dann ohne weitere Stimulation der Tochterzellen durch Antigene stattfinden (van Stipdonk 2001). Von den hier getesteten Peptiden waren lediglich zwei synthetische CVB3 Peptide, CVB3 VP2_[273-281] und CVB3 VP2_[285-293], in der Lage, die MHC Klasse I Moleküle mit einer Dauer von mindestens zwei Stunden auf der Zelloberfläche zu stabilisieren. Das potentielle Epitop CVB3 Pol_[2170-2177] hat zwar mit hoher Affinität an H-2K^b-Moleküle gebunden, diese aber weniger als eine Stunde auf der Zelloberfläche stabilisiert. Allen drei Peptiden wurden in der Vorhersage hohe Scoringwerte für die MHC und TAP Bindung zugeordnet. Alle übrigen ausgewählten CVB3 Peptide haben mit geringer oder mittlerer Affinität an MHC Klasse I Moleküle gebunden. Deren Kapazität zur Stabilisierung der Peptid-MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche betrug weniger als eine Stunde. Vermutlich ist der destabilisierende Einfluss sekundärer Aminosäuren auf die Peptid-MHC-Bindung größer als angenommen. Ferner spiegelt die Vorhersage durch SYFPEITHI lediglich die Präferenz individueller Aminosäuren an einer bestimmten Position wieder. Dabei werden alle Positionen unabhängig voneinander betrachtet und Wechselwirkungen benachbarter Aminosäuren werden nicht berücksichtigt (Rammensee 1999).

Eine computerbasierte Vorhersage allein ist daher nicht ausreichend, um die Präsentation der Peptide zu ermitteln. In jedem Fall müssen die Ergebnisse experimentell belegt werden, um eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Präsentation treffen zu können.

4.1.2 Die Reaktivität der vorhergesagten CVB3 Epitope

Die Bindung der Peptide an MHC Klasse I Moleküle und deren Fähigkeit, diese auf der Zelloberfläche zu stabilisieren, war ein erster Hinweis auf die Relevanz einiger vorhergesagter Peptide in der Immunantwort bei einer CVB3 Infektion. Für eine weitere Charakterisierung und für eine erste Bestimmung der Immunrelevanz der Peptide wurden diese auf ihre Fähigkeit getestet, Milzzellen von infizierten C57BL/6 Mäusen zu aktivieren, und zur Proliferation anzuregen. Insgesamt waren die Proliferationswerte niedrig, reproduzierbare Aussagen zur stimulierenden Wirkung der ausgewählten Peptide konnten dennoch getroffen werden. Die stimulierende Wirkung der potentiellen CVB3 Epitope auf die Proliferation konnte sowohl bei Milzzellen als auch bei separierten CD8⁺ T Zellen beobachtet werden. Das Peptid CVB3 VP2_[285-293] wies eine hohe Stabilisierungskapazität von MHC Klasse I Molekülen auf und zeigte die höchste stimulierende Wirkung auf die Proliferationsrate der Milzzellen. Diese war nur bei Zellen zu beobachten, die infizierten C57BL/6 Mäusen entnommen wurden. Diese Beobachtungen stimmen mit Arbeiten zu MHC Klasse I restringierten Epitopen des Hepatitis B Virus und des humanen Papillomavirus überein. Diese zeigten eine größere Korrelation zwischen Stabilität der Peptid-MHC-Komplexe und der Immunogenität der Peptide als zwischen Affinität und Immunogenität (van der Burg 1996). Da aber die Affinität der Peptide die Stabilität der Peptid-MHC-Bindung beeinflusst, kann auch eine niedrige Affinität indirekt ursächlich sein für eine geringe Immunogenität. Von den Peptiden, deren Kapazität zur MHC Klasse I Stabilisierung weniger als zwei Stunden betrug, war das potentielle Epitop CVB3 Pol_[2170-2177] in der Lage, eine peptidspezifische Proliferation auszulösen. Die Beobachtung, dass Peptide trotz geringer Stabilisierungskapazität eine IFN- γ -Sekretion auslösen können, wurde bereits in einer Untersuchung bei einer Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus gemacht (Elkington 2003). Das könnte für die Kompensation einer geringen Stabilisierungskapazität des Epitops auf der Zelloberfläche durch eine effiziente Generierung sprechen. Möglicherweise wird so eine Präsentationsdichte auf der Zelloberfläche erreicht, die zur Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes für die Aktivierung von CD8⁺ T Zellen ausreichend ist.

Bei der experimentellen Überprüfung von Vorhersageergebnissen muss also ein hoher Anteil nicht immunogener Liganden berücksichtigt werden. Ferner dient der verwendete Algorithmus SYFPEITHI lediglich der Vorhersage der MHC Klasse I Bindung, deren Ergebnis Hinweise auf die Reaktivität der Epitope geben kann. Weitere Faktoren, die auf die Präsentation eines Epitops Einfluß nehmen, werden jedoch nicht berücksichtigt: Die präsentierten Peptide müssen zunächst generiert werden. Produkte der durch Proteasomen vermittelten Generierung können sowohl das

präsentierte Epitop als auch N-terminal verlängerte Epitopvorläuferpeptide sein. Nach Generierung erfolgt der Transport in das ER durch den TAP, der durch seine Spezifität ebenfalls auf die Präsentation der Peptide Einfluss nimmt (Burgevin 2008). N-terminal verlängerte Epitopvorläufer müssen zudem entweder im Zytosol oder im ER durch Aminopeptidasen weiter prozessiert werden (Kloetzel 2004).

Die Proliferationstests gaben erste Hinweise auf die Existenz von peptidspezifischen CD8⁺ T Zellen. Eine genauere Analyse antigenspezifischer Reaktionen während einer CVB3 Infektion erfolgte mittels Durchflusszytometrie, bei der die IFN- γ -Sekretion durch CD8⁺ T Zellen bestimmt wurde. Von den hier eingesetzten CVB3 Peptiden hat lediglich das Peptid CVB3 VP2_[285-293] eine antigenspezifische IFN- γ -Sekretion durch CD8⁺ T Zellen ausgelöst. Diese war von der Peptidkonzentration abhängig und nur bei Zellen zu beobachten, die C57BL/6 Mäusen nach einer CVB3 Infektion entnommen wurden. Das Peptid CVB3 Pol_[2170-2177], das eine leichte Steigerung der Proliferationsrate von Milzzellen ausgelöst hat, hat keine IFN- γ -Sekretion hervorgerufen. Denkbar ist, dass es sich bei den proliferierenden Zellen um Effektorzellen handelt, deren Funktion nicht die Sekretion von IFN- γ , sondern die Sekretion von TNF- α oder Granzymen und Perforinen ist.

Immunantworten, die durch CD8⁺ T Zellen vermittelt werden, sind in der Regel auf wenige Epitope beschränkt. Dieses Phänomen ist als Immundominanz bekannt (Yewdell 2004). Immundominante Epitope führen bereits in geringen Konzentrationen zu einer durch CD8⁺ T Zellen vermittelten Immunantwort. Bei subdominanten Epitopen ist eine deutlich höhere Konzentration der Peptide notwendig, um eine T Zellstimulation hervorzurufen (Busch 1998; Sette 1994). Zum Beispiel wird die Immunantwort in C57BL/6 Mäusen auf eine Infektion mit Vaccinia Virus von fünf MHC Klasse I restringierten Epitopen bestimmt (Tscharke 2005), die Immunantwort auf eine Infektion von Balb/c Mäusen mit dem murinen Cytomegalovirus von zwei Epitopen dominiert (Holtappels 2002). Jedoch konnten auch breitere durch CD8⁺ T Zellen vermittelte Immunantworten detektiert werden (Munks 2006). Immundominanzhierarchien variieren damit in Abhängigkeit von Virus und MHC Haplotyp (Yewdell 2006). Epitope aus viralen Strukturproteinen, oder aus der Sequenz von stark exprimierten viralen Proteinen scheinen dabei häufiger immundominant zu sein, als solche aus weniger stark exprimierten Proteinen oder solche aus Nicht-Strukturproteinen. Tatsächlich konnten immunrelevante Epitope aus der Sequenz des Strukturproteins VP2 des Theilerenzephalomyelitivirus, das ebenfalls zur Gruppe der *Picornaviridae* gehört, identifiziert werden (Lyman 2002). Was aber genau Epitope zu immunrelevanten macht, unabhängig ob immundominant oder subdominant, ist bisher nicht

bekannt (Munks 2006). Man geht davon aus, dass die Immundominanz von der Effizienz beeinflusst wird, mit der ein Epitop generiert wird, von dessen Bindungskapazität und vom T Zellrepertoire. Die Affinität des TcR zum Peptid-MHC-Komplex bestimmt ebenfalls die durch CD8⁺ T Zellen vermittelte Immunantwort (Yewdell 1999).

Die Stabilisierungskapazität des Peptids CVB3 VP2_[285-293] entspricht der anderer immundominanter Epitope, für die eine direkte Korrelation von Peptid-MHC-Stabilität und Immundominanz nachgewiesen werden konnte (Busch 1998). Die Affinität des Peptids mit 2,2µM liegt jedoch unter der anderer immundominanter Epitope (Sette 1994). Die Zahl der IFN-γ-sezernierenden CD8⁺ T Zellen (1,5%) und die notwendige Peptidkonzentration von 5µM zur Stimulation der IFN-γ-Sekretion sind trotz der hohen Stabilisierungskapazität Anhaltspunkte für ein subdominantes Epitop.

Zu den Schwierigkeiten bei der Identifikation immunrelevanter CVB3 Epitope trägt die geringe Immunogenität von CVB3 bei (Kemball 2008). Um einer Immunantwort durch den Wirtsorganismus zu entgehen, haben sich virale Mechanismen entwickelt, die zu einer geringen Immunogenität beitragen. CVB3 Proteine hemmen den Proteintransport der Wirtszellen: Das CVB3 Protein 2B erhöht die Membranpermeabilität des Golgi Apparates und inhibiert den anterograden Proteintransport der Wirtszelle. Das CVB3 Protein 3A zerstört den Golgi Apparat, was zur Akkumulation von Proteinen im ER der Wirtszelle führt, und die CVB3 Proteine 2BC und 2B vermitteln die Endozytose. Insgesamt führen diese Vorgänge zu einer reduzierten Expression von MHC Klasse I Molekülen und damit zu einer limitierten Präsentation von CVB3 Peptiden auf der Zelloberfläche infizierter Zellen (Cornell 2006; Cornell 2006; de Jong 2006). Die Menge der Peptid-MHC-Komplexe ist möglicherweise nicht ausreichend, um eine Aktivierung von naiven CD8⁺ T Zellen auszulösen, die zu einer starken adaptiven Immunantwort führt. Für die Aktivierung von naiven CD8⁺ T Zellen ist eine bestimmte Dichte an Peptid-MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche notwendig (Lanzavecchia 2000). Für das eng verwandte Poliovirus konnten dennoch epitopspezifische CD8⁺ T Zellen identifiziert werden. Allerdings war eine mehrmalige Stimulation der T Zellen *ex vivo* notwendig (Mandl 1998). Ein solcher experimenteller Ansatz hätte vermutlich auch für die CVB3 Epitope zu einer besseren Identifikation von epitopspezifischen T Zellen beitragen können, und so Aussagen über die Immunnierarchie ermöglicht.

Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass das Peptid CVB3 VP2_[285-293] ein immundominantes CVB3 Epitop ist. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es zu der Gruppe der subdominanten CVB3 Epitope gehört.

4.2 Die Rolle von Immunoproteasomen bei der Generierung potentieller CVB3 Epitope

Eine der Voraussetzungen für die Präsentation von Epitopen ist deren Generierung. Das Ubiquitin-Proteasom-System als zentrale Komponente der intrazellulären Proteindegradation gewährleistet mit der ATP- und ubiquitinabhängigen Degradation von Proteinen die zelluläre Homöostase, und trägt maßgeblich zur Generierung MHC Klasse I restringierter Epitope bei (Kloetzel 2004; Strehl 2005). Produkte der proteasomenvermittelten Degradation sind Peptide unterschiedlicher Länge, die durch zytosolische Aminopeptidasen letztlich zu Aminosäuren abgebaut werden. Ungefähr 1% der proteasomalen Degradationsprodukte werden MHC Klasse I restringiert auf der Zelloberfläche präsentiert (Princiotta 2003). Die Generierung antigener Determinanten ist der limitierende Schritt in der Antigenpräsentation (Benham 1997). Eine virale Infektion führt zu einer Veränderung der auf der Zelloberfläche präsentierten Peptide. Ursächlich sind einerseits die intrazelluläre Expression und der Abbau viraler Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System, andererseits die veränderten katalytischen Eigenschaften von 20S Proteasomen nach Inkorporation der Immunountereinheiten (Pamer 1998). Die Inkorporation der Interferon induzierbaren katalytischen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ in *de novo* assemblierende 20S Proteasomen führt zu einer verbesserten Generierung viraler Epitope (Sijts 2000a; Sijts 2000b; Schwarz 2000b). Die bei Immunoproteasomen beobachtete Reduktion der proteolytischen Aktivität nach sauren und die erhöhte Aktivität nach basischen und hydrophoben Aminosäuren begünstigt die Bildung von MHC Klasse I restringierten Epitopen, da basische und hydrophobe Aminosäuren häufig die Ankerreste für die Bindung an MHC Klasse I Moleküle darstellen (Kuckelkorn 1995; Falk 1991; Rammensee 1999).

Trotz zahlreicher Untersuchungen zur Rolle von CD8⁺ T Zellen in der CVB3 induzierten Myokarditis ist über die Generierung von MHC Klasse I restringierten CVB3 Epitopen bisher nichts bekannt und Epitope selbst nicht identifiziert (Opavsky 1999; Henke 1995; Klingel 2003). Neben der Identifikation von H-2^b-restringierten CVB3 Epitopen sollte daher in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer CVB3 Infektion auf die Zusammensetzung und proteolytische Aktivität von 20S Proteasomen in Herzen untersucht werden. Ein besonderes Interesse galt möglichen Unterschieden hinsichtlich Antigenprozessierung und -präsentation im akuten und chronischen Verlauf der CVB3 induzierten Myokarditis mit Hilfe eines Tiermodells.

Zunächst wurde die Degradation von sechs Polypeptidsubstraten aus der Aminosäuresequenz des CVB3 mit Standard- und Immunoproteasomen, die aus T2 und T2.27mp Zellen isoliert wurden, in *in vitro* Degradationsexperimenten untersucht. Immunoproteasomen degradierten die eingesetzten

CVB3 Polypeptidsubstrate im Durchschnitt bis zu dreimal schneller als Standardproteasomen. Nicht bei allen analysierten Substraten wurde eine Generierung der potentiellen Epitope oder deren N-terminal verlängerter Vorläuferpeptide beobachtet. Zwar wurden alle Polypeptide vollständig durch 20S Proteasomen degradiert, aber der Schnitt, der zur Bildung des korrekten C-Terminus immunrelevanter Fragmente führt, konnte bei den Polypeptidsubstraten CVB3 VP2_[238-263] und CVB3 Pol_[1892-1917] nicht detektiert werden. Im Gegensatz zu anderen Proteasen besitzt das Proteasom keine klar definierte Schnittspezifität oder ein definiertes Schnittmotiv. Die Hydrolyse von Peptidbindungen kann daher innerhalb verschiedener Aminosäuremuster erfolgen. Einfluss auf die Schnittstellen haben die Sequenz des Epitops selbst und die N- und C-terminal flankierenden Sequenzen (Theobald 1998; Niedermann 1995; Seifert 2004).

Die Ergebnisse der *in vitro* Degradationsexperimente mit den Substraten CVB3 VP2_[272-302] und CVB3 Pol_[2158-2185] zeigten, dass Immunoproteasomen nicht nur eine höhere Substratumsatzrate aufwiesen, sondern dass zusätzlich größere Mengen der potentiellen Epitope CVB3 VP2_[285-293] und CVB3 Pol_[2170-2177] gebildet wurden. Die proteasomal generierten potentiellen CVB3 Epitope oder Epitopvorläufer wurden grundsätzlich auch durch Standardproteasomen generiert. Die erhöhte Schnittfrequenz zwischen den Peptidbindungen M_[284]-F_[285] und M_[293]-V_[294] im CVB3 VP2_[272-302] Polypeptidsubstrat durch Immunoproteasomen führte jedoch zu einer verstärkten Freisetzung des potentiellen Epitops CVB3 VP2_[285-293]. Für das Substrat CVB3 Pol_[2158-2185] resultierte die erhöhte Schnittfrequenz nach L_[2177] in einer verbesserten Generierung des C-Terminus des potentiellen Epitops CVB3 Pol_[2170-2177] und dessen N-terminal verlängerten Epitopvorläuferpeptiden. Korrelierend mit publizierten Ergebnissen (Boes 1994; Toes 2001) konnte insgesamt eine erhöhte Schnitthäufigkeit nach hydrophoben Aminosäuren und eine Reduktion der Schnittfrequenz nach sauren Aminosäuren beobachtet werden. Leicht veränderte Produktspektren der degradierten CVB3 Substrate waren nicht das Ergebnis qualitativ veränderter Schnitte durch Immunoproteasomen, sondern das Ergebnis von veränderten Kombinationen bei der Nutzung von Schnittstellen. Die veränderten proteolytischen Eigenschaften von Immunoproteasomen können nur bedingt mit Veränderungen der Aminosäuresequenz der Bindungstaschen der katalytischen Untereinheiten von 20S Proteasomen erklärt werden. Diese ist jeweils stark konserviert. Der Austausch von zwei Aminosäuren in der Bindungstasche der Untereinheit $\beta 1$ führt zu einer veränderten Ladung von positiv ($\beta 1$) zu neutral ($i\beta 1$). Dieser Austausch kann für die Reduktion der peptidylglutamylpeptidhydrolysierenden Aktivität ursächlich sein. Es ist aber nicht auszuschließen, dass substratinduzierte Konformationsänderungen Flexibilität und Größe der

Bindungstaschen beeinflussen, und so ebenfalls zu einer Veränderung der Schnittpräferenz beitragen (Unno 2002; Groll 2004; Bech-Otschir 2009).

Die Veränderung der Schnittpräferenz und die Erhöhung der Substratumsatzrate durch Immunoproteasomen führt nicht ausschließlich zu einer verbesserten Generierung MHC Klasse I präsentierter Epitope, sondern auch zu einer vermehrten Zerstörung der potentiellen CVB3 Epitope. Die erhöhten Schnittfrequenzen C-terminal von den Aminosäuren M_[285] und L_[292] in dem Polypeptidsubstrat CVB3 VP2_[272-302] führten zur Bildung des oktameren Peptids CVB3 VP2_[285-292], und haben damit epitopzerstörende Wirkung. Auch in dem Polypeptid CVB3 Pol_[2158-2185] konnten Schnitte C-terminal der Aminosäuren S_[2174] und L_[2170] detektiert werden, die verstärkt durch Immunoproteasomen generiert wurden, und die Bildung des potentiellen Epitops CVB3 Pol_[2170-2177] unmöglich machten. Die Analyse der Produkte mittels ESI Massenspektrometrie erlaubt keine absolute Quantifizierung. Damit ist der direkte Vergleich der generierten Menge immunrelevanter Fragmente und der Menge von Peptiden, deren Generierung die Bildung immunrelevanter Fragmente verhindert, nicht möglich. Mit den Ergebnissen der rein massenspektrometrischen Untersuchungen kann also keine Aussage darüber getroffen werden, ob die proteasomale Degradation eines Substrats zu einer Epitopgenerierung oder zu einer Epitopzerstörung führt. Dieses Problem versucht eine von Strehl *et al.* vorgeschlagene Methode zu lösen. Mit Hilfe einer semiquantitativen Auswertung konnte bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* eine Verschiebung der Verhältnisse zugunsten der Generierung immunrelevanter Produkte durch Immunoproteasomen nachgewiesen werden (Strehl 2008). Auch bei der Generierung immunrelevanter Fragmente aus CVB3 Polypeptidsubstraten durch Standard- und Immunoproteasomen konnte eine solche Verschiebung zugunsten der potentiellen Epitope CVB3 VP2_[285-293] und CVB3 Pol_[2170-2177] beobachtet werden (keine Abbildung). Immunoproteasomen zeigen damit eine Präferenz für die Bildung von Epitopen oder deren N-terminal verlängerten Vorläuferpeptiden.

Effizienz und Spezifität der Degradation intrazellulärer Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System bestimmen die Peptide, die für die MHC Klasse I restringierte Epitoppräsentation zur Verfügung stehen. Bei der Degradation von CVB3 Peptiden wird die Generierung der MHC Klasse I restringierten CVB3 Epitope, und auch die Kinetik der Generierung, maßgeblich durch Immunoproteasomen beeinflusst.

4.3 Die Rolle von PA28 bei der Generierung potentieller CVB3 Epitope

Einfluss auf die Epitopgenerierung hat neben den Immununtereinheiten auch der Proteasomenaktivator PA28. Die Assoziation von PA28 an 20S Proteasomen führt häufig zu einer verbesserten Generierung von MHC Klasse I restringierten Epitopen (van Hall 2000; Groettrup 1996; Schwarz 2000a). Bei der Analyse des Einflusses von PA28 auf die Degradation von CVB3 Polypeptidsubstraten wurde in Anwesenheit von PA28 eine erhöhte Substratabbauraten beobachtet, die unabhängig vom Typ assoziierter 20S Proteasomen war. Basierend auf der PA28 bedingten Erhöhung der Substratumsatzrate konnten größere Mengen immunrelevanter Fragmente detektiert werden. Unterschiede in den Schnittpräferenzen von Standard- und Immunoproteasomen bei der Degradation der CVB3 Polypeptidsubstrate blieben nach Assoziation von PA28 bestehen, waren jedoch weniger stark ausgeprägt. Die potentiellen CVB3 Epitope wurden grundsätzlich auch durch Standardproteasomen generiert. Eine verbesserte Generierung kann damit auf der erhöhten Substratumsatzrate in Anwesenheit von PA28 beruhen, und damit liesse sich der größere Einfluss von PA28 auf Standardproteasomen erklären. Die Assoziation von PA28 würde die vergleichsweise ineffizientere Generierung immunrelevanter Fragmente durch Standardproteasomen kompensieren. Dennoch hat PA28 auch Einfluss auf die Schnittpräferenzen von 20S Proteasomen. Eine Generierung potentieller CVB3 Epitope ausschließlich in Gegenwart von PA28, wie sie für ein Tumorepitop des TRP2 gezeigt wurde (Sun 2002), wurde nicht beobachtet. Es konnten aber Degradationsprodukte detektiert werden, die unabhängig vom Typ der 20S Proteasomen ausschließlich in Gegenwart von PA28 generiert wurden. Der Einfluss von PA28 ist damit nicht auf die Kinetik der Substratdegradation beschränkt, auch wenn die Schnittpräferenzen von Proteasomen in erster Linie durch die inkorporierten katalytischen Untereinheiten determiniert werden.

Für die Erhöhung der Substratdegradationsrate durch PA28 können verschiedene Mechanismen ursächlich sein. Die Assoziation von PA28 an den 20S *core* Partikel ruft eine Stabilisierung der offenen Konformation von 20S Proteasomen hervor, und führt zu einer erhöhten Substrataffinität, während die Maximalgeschwindigkeit unverändert bleibt (Stohwasser 2000). Dadurch können ein verbesserter Substrateintritt und eine schnellere Translokation der Substrate in das Innere von 20S Proteasomen erreicht werden (Zhang 1998; Förster 2005; Stohwasser 2000; van Hall 2000). Denkbar ist ein Mechanismus, wie er für die Degradation polyubiquitiniertter Substrate durch 26S Proteasomen beschrieben wurde. Die Bindung polyubiquitiniertter Substrate an den 19S Regulator verursacht Konformationsänderungen des 20S *core* Partikels, und resultiert in einer stabilen offenen Konformation mit verbessertem Zugang der Substrate zu den katalytischen

Untereinheiten. Dadurch wird eine Stimulation der Substratdegradation erreicht (Bech-Otschir 2009). Eine durch PA28 induzierte Konformationsänderung von 20S Proteasomen könnte zudem ursächlich sein für qualitativ veränderte Schnittmuster (Sun 2002).

PA28 und die Immununtereinheiten scheinen hinsichtlich der katalytischen Eigenschaften von 20S Proteasomen zunächst ähnliche Effekte zu haben: Sowohl die Assoziation von PA28 an den 20S *core* Partikel als auch die Inkorporation der induzierbaren katalytischen Untereinheiten in 20S Proteasomen führten zu einer schnelleren Degradation der CVB3 Polypeptidsubstrate und zu einer Modifikation der Schnittpräferenzen. Eine Redundanz der Funktionen der Immununtereinheiten und der von PA28 bei der Generierung potentieller CVB3 Epitope konnte in der vorliegenden Arbeit dennoch nicht beobachtet werden. Vielmehr scheinen sich die Funktionen bei der Epitopgenerierung zu ergänzen. Die Assoziation von PA28 an 20S Standardproteasomen kompensiert die Funktion der Immununtereinheiten bei der Generierung immunrelevanter Fragmente nicht vollständig. Unterschiede in der generierten Menge zwischen Standard- und Immunoproteasomen blieben nach Assoziation von PA28 bestehen, allerdings weniger stark ausgeprägt. Diese sich ergänzenden Funktionen der Immununtereinheiten und von PA28 können in lymphatischen Zellen oder Geweben von Bedeutung sein. Bei der Behandlung von Zellen lymphatischen Ursprungs mit Typ I oder II IFN wurde keine Veränderung der Zusammensetzung von 20S Proteasomen erreicht, wie am Beispiel der Makrophagenlinie Raw264.7 gezeigt (und persönliche Mitteilung Melanie Rieger). Die inkorporierten Immununtereinheiten gewährleisten eine effiziente Schnittgenerierung nach hydrophoben und basischen Aminosäuren unabhängig von einer Inflammation. Im Gegensatz zu der unveränderten Zusammensetzung von 20S Proteasomen in lymphatischen Zellen erhöht sich durch die exogene Stimulation der Zellen mit IFN- β oder IFN- γ der Anteil von 20S Proteasomen, der mit PA28 assoziiert vorliegt. IFN- β und IFN- γ haben damit Einfluss auf die Assoziation von 20S Proteasomen mit Regulatoren. Unter dem Einfluss von IFN- γ kommt es zur Dephosphorylierung der proteasomalen Untereinheit $\alpha 7$, was auf die Assoziation des 19S Regulators und des 20S *core* Partikels destabilisierend wirkt. Das führt zu einer reduzierten Zahl an 26S Proteasomen in der Zelle, und eine Assoziation von PA28 mit 20S Proteasomen wird begünstigt (Bose 2001; Bose 2004). Die Assoziation von PA28 und 20S Proteasomen kann damit zu einer veränderten Präsentationskinetik der H-2^b-restringierten CVB3 Epitope führen. Dadurch wiederum können die Aktivierung von naiven CD8⁺ T Zellen und die Immunogenität von Epitopen beeinflusst werden (Lay 2009; Deol 2007).

In Zellen nicht lymphatischen Ursprungs, wie am Beispiel von Fibroblasten und Kardiomyozyten gezeigt, führt die exogene Stimulation mit IFN- β oder IFN- γ zur Inkorporation der

Immunountereinheiten in 20S Proteasomen sowie zu einer verstärkten Expression der PA28 Untereinheiten PA28 α und PA28 β , und zu einer verstärkten Assoziation von PA28 und 20S Proteasomen. Da in der Zelle ungefähr 15 \pm 10% der PA28 Heptamere als freie Komplexe und ca. 31 \pm 4% als freie 20S Proteasomen vorliegen (Tanahashi 2000), ist vorstellbar, dass es nach einer Stimulation von Zellen mit IFN- β oder IFN- γ zunächst zu einer verstärkten Assoziation der freien PA28 Heptamere an vorwiegend Standardproteasomen kommt. Die damit vorerst erreichte effizientere Generierung immunrelevanter CVB3 Fragmente durch die Erhöhung des Substratumsatzes kann die Zeit bis zur Assemblierung von Immunoproteasomen überbrücken. Unterstützt wird die Hypothese durch die Beobachtung der verstärkten proteolytischen Aktivität von 20S Proteasomen bereits vor Inkorporation der Immunountereinheiten (persönliche Mitteilung Melanie Rieger). Nach Assemblierung von Immunoproteasomen und der Assoziation mit PA28 ermöglichen die sich ergänzenden Effekte von PA28 und den Immunountereinheiten dann eine effiziente Präsentation MHC Klasse I restringierter Epitope für die Einleitung der adaptiven Immunantwort.

4.4 Die Rolle von Kardiomyozyten in der Antigenpräsentation in einer CVB3 Infektion

Während einer CVB3 Infektion kommt es zur Infiltration von Zellen lymphatischen Ursprungs in Herzen (Szalay 2006a). Die Zunahme von 20S Proteasomen, die mindestens eine der Immunountereinheiten inkorporiert haben, kann daher auf die Infiltration von lymphatischen Zellen zurückzuführen sein, in denen die Immunountereinheiten unabhängig von einer Inflammation nachgewiesen werden können. Ursächlich kann aber auch die Induktion von i β 1, i β 2 und i β 5 in Kardiomyozyten und Fibroblasten sein. *In vitro* resultierte die Behandlung von Kardiomyozyten und Fibroblasten mit Typ I oder II IFN in einer verstärkten Inkorporation in *de novo* assemblierende 20S Proteasomen. Außerdem wurde eine verstärkte Assoziation von PA28 und 20S Proteasomen beobachtet.

Auch poly (I:C) als synthetisches Analogon von dsRNA führte zu einer erhöhten Expression der Immunountereinheiten in Kardiomyozyten. Die Detektion von poly (I:C) durch den TLR3 führt zu der Phosphorylierung und somit Aktivierung von IRF3, zur Aktivierung des NF κ B Signaltransduktionsweges und schließlich zu der Sekretion von TNF- α und Typ I IFN (Kawai 2006). Durch die Aktivierung des TLR3 während einer CVB3 Infektion kann ferner die Sekretion von IFN- γ ausgelöst werden (Negishi 2008). Sowohl durch Typ I und II IFN als auch

durch TNF- α kann die Expression der Immununtereinheiten induziert werden (Shin 2006; Hallermalm 2001). Diese Zytokinsekretion führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen, und zur Anpassung des Ubiquitin-Proteasom-Systems an den inflammatorischen Zustand (Medzhitov 2007; Strehl 2005). Ob die Veränderungen der Zusammensetzung von 20S Proteasomen auf die Sekretion von TNF- α oder IFN zurückzuführen sind, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Die Detektion viraler RNA durch Rezeptoren von Kardiomyozyten kann zu einer effizienteren Generierung MHC Klasse I restringierter Epitope und zu einer verstärkten Präsentation der Epitope auf der Zelloberfläche führen, und kann schließlich in einer schnellen Elimination virusinfizierter Kardiomyozyten resultieren.

4.5 Antigenprozessierung durch 20S Proteasomen in der CVB3 Infektion

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung von 20S Proteasomen in verschiedenen Organen in Abhängigkeit von deren Herkunft variiert. In Organen lymphatischen Ursprungs, wie Milz oder Thymus, werden die Immununtereinheiten unabhängig von einer Inflammation exprimiert. In Organen nicht-lymphatischen Ursprungs dagegen, zum Beispiel Colon oder Leber, werden hauptsächlich die konstitutiven katalytischen Untereinheiten exprimiert. Diese Unterschiede in der Zusammensetzung werden auch auf funktioneller Ebene deutlich: 20S Proteasomen, die aus Milz, Thymus oder Dünndarm isoliert wurden, generierten eine größere Menge eines Epitopvorläufers als 20S Proteasomen aus Colon oder Leber (Kuckelkorn 2002). Darüberhinaus konnte eine transiente Veränderung von 20S Proteasomen in Organen nicht-lymphatischen Ursprungs während einer Infektion in Abhängigkeit von einer IFN- γ Ausschüttung beobachtet werden. Die zunehmende Inkorporation der Immununtereinheiten in 20S Proteasomen war ursächlich für eine verstärkte Generierung immunrelevanter Fragmente. Eine solche Anpassung erfolgte in lymphatischen Organen nicht (Strehl 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beziehung zwischen Zusammensetzung und Funktion von 20S Proteasomen vergleichend für einen akuten und chronischen Verlauf einer viralen Infektion untersucht. Mit Hilfe eines Tiermodells wurde die Rolle von 20S Proteasomen in der Antigenpräsentation bei einer Infektion mit CVB3 analysiert: C57BL/6 Mäuse entwickeln nach einer Infektion mit CVB3 eine protektive Immunantwort, die zu einer Elimination der Viren führt und in einer vollständigen Ausheilung der Infektion resultiert. A.BY/SnJ Mäuse dagegen weisen einen höheren Virustiter im Verlauf der CVB3 Infektion auf, es erfolgt keine vollständige Elimination der Viruspartikel. In der Folge kann sich eine chronische Myokarditis manifestieren

(Klingel 1992; Szalay 2006b). Die Elimination CVB3 infizierter Zellen wird dabei maßgeblich durch CD8⁺ T Zellen vermittelt (Klingel 2003). Das Ausmaß und die Immundominanzhierarchie der durch CD8⁺ T Zellen vermittelten Immunantwort werden durch die Zahl und die Stabilität der Peptid-MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche professionell antigenpräsentierender Zellen beeinflusst (Busch 1998; Gallimore 1998; van der Burg 1996). Eine effiziente Generierung von H-2^b-restringierten CVB3 Epitopen und einer damit verbundenen Präsentation auf der Zelloberfläche kann zu einer effektiven Aktivierung von naiven CD8⁺ T Zellen beitragen und zu einer Elimination von CVB3 infizierten Zellen führen. In C57BL/6 Mäusen nimmt während einer Infektion mit CVB3 die Zahl der CD8⁺ T Zellen ab Tag 8 nach Infektion zu, in A.BY/SnJ Mäusen hingegen ist die Zahl fast unverändert. Ursache könnte ein Defekt in der Aktivierung von naiven CD8⁺ T Zellen sein (Weinzierl 2008). Die Aktivierung findet in den sekundären lymphatischen Organen statt und erfordert eine Interaktion des TcR mit dem Peptid-MHC-Komplex auf der Zelloberfläche professionell antigenpräsentierender Zellen sowie weitere kostimulatorische Signale (Andersen 2006). Stärke und Dauer der Expansion von CD8⁺ T Zellen hängen von Zeitpunkt, Dauer und Geschwindigkeit der Produktion von professionell antigenpräsentierenden Zellen ab. Die Kinetik der Produktion professionell antigenpräsentierender Zellen ist dabei sowohl von dem Antigen selbst als auch von dem proinflammatorischen Milieu abhängig (Lay 2009). Die Sekretion von IFN- γ in der Milz zeigt in C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen einen unterschiedlichen Verlauf. In C57BL/6 Mäusen wurde eine deutliche Induktion am Tag 4 nach CVB3 Infektion beobachtet, die höchste IFN- γ Konzentration konnte am Tag 12 nach CVB3 Infektion ermittelt werden. In A.BY/SnJ Mäusen dagegen war die Induktion insgesamt schwächer, und es war eine kontinuierliche Zunahme bis in die chronische Phase (Tag 28 nach CVB3 Infektion) zu beobachten. Die sezernierte Menge an IFN- γ erreichte in A.BY/SnJ Mäusen über den gesamten Zeitraum nicht die der C57BL/6 Tiere (Szalay 2006b).

Die Sekretion von IFN beeinflusste die Zusammensetzung der 20S Proteasomen in der Milz nicht. Die Expression der Immununtereinheiten und von PA28 α und PA28 β war, unabhängig vom Mausstamm, unverändert. Bereits in nicht-infizierten Tieren konnten die induzierbaren katalytischen Untereinheiten nachgewiesen werden, deren Menge sich im Verlauf der Infektion nicht veränderte. Korrelierend mit der unveränderten Zusammensetzung von 20S Proteasomen konnten Unterschiede bei der Substratdegradation und bei der Generierung potentieller CVB3 Epitope durch isolierte 20S Proteasomen aus der Milz zwischen C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen oder zwischen nicht-infizierten und infizierten Tieren nicht beobachtet werden. Mögliche Unterschiede bei der Aktivierung von naiven CD8⁺ T Zellen können demnach nicht auf der

Zusammensetzung von 20S Proteasomen beruhen. Durch IFN- γ wird nicht allein die Expression der induzierbaren katalytischen Untereinheiten und die von PA28 α und PA28 β beeinflusst, sondern ebenfalls die Assoziation von PA28 und 20S Proteasomen (Realini 1994; Bose 2001; Bose 2004), und für die Generierung immunrelevanter CVB3 Fragmente konnte ein positiver Einfluss von PA28 auf die generierte Menge nachgewiesen werden. Eine effiziente Generierung beeinflusst wiederum die Zahl der Peptid-MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche professionell antigenpräsentierender Zellen positiv. Eine verzögerte Assoziation von PA28 an 20S Proteasomen in A.BY/SnJ Mäusen, hervorgerufen durch die im Vergleich mit C57BL/6 Mäusen schwache und zeitlich verzögerte Sekretion von IFN- γ , könnte somit die Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen in der Zahl der CD8 $^+$ T Zellen während einer Infektion mit CVB3 erklären. Ursächlich kann also zum einen eine verzögerte Prozessierung und Präsentation der CVB3 Epitope sein, oder die generierte Menge der CVB3 Epitope ist nicht ausreichend, um den Schwellenwert für eine Aktivierung von CD8 $^+$ T Zellen zu erreichen. Bei einem Vergleich der durch CD8 $^+$ T Zellen vermittelten Immunantwort in Wildtyp C57BL/6 und i β 5 und i β 2 doppelt defizienten C57BL/6 Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Kinetik, mit der ein Epitop auf der Zelloberfläche erscheint, entscheidend für den Verlauf einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* ist (Deol 2007). Die Assoziation von PA28 an 20S Proteasomen bewirkt eine Erhöhung der Degradationsgeschwindigkeit der synthetischen CVB3 Polypeptide und eine Erhöhung der Menge der generierten immunrelevanten Fragmente. Insgesamt beeinflusst PA28 damit die Kinetik der Generierung und Präsentation von CVB3 Epitopen. Eine zeitlich verzögerte Assoziation von PA28 an 20S Proteasomen antigenpräsentierender Zellen kann damit die Aktivierung von naiven CD8 $^+$ T Zellen beeinflussen.

In Herzen führte eine Infektion mit CVB3 in beiden Mausstämmen zu einer Induktion der Expression und Inkorporation der Immununtereinheiten, und somit zu einer veränderten Zusammensetzung von 20S Proteasomen. Eine deutliche Zunahme der Immununtereinheiten konnte in den Herzen von C57BL/6 Mäusen am Tag 4 nach CVB3 Infektion beobachtet werden. Dieser Anstieg inkorporierter Immununtereinheiten war transient und das Ausgangsniveau am Tag 8 nach CVB3 Infektion fast wieder erreicht. Im Gegensatz dazu war in A.BY/SnJ Mäusen die Induktion der Immununtereinheiten zeitlich verzögert. Eine deutliche Zunahme war in den Herzen von A.BY/SnJ Mäusen erst am Tag 8 nach CVB3 Infektion zu beobachten. Die Inkorporation der Immununtereinheiten verursachte eine veränderte proteolytische Aktivität der 20S Proteasomen. 20S Proteasomen aus Herzen infizierter A.BY/SnJ und C57BL/6 Mäuse generierten, unabhängig vom Tag der Infektion, größere Mengen immunrelevanter Fragmente als

20S Proteasomen aus Herzen von naiven Tieren. Die höchste Substratdegradationsrate und die größten Mengen generierter potentieller CVB3 Epitope oder N-terminal verlängerter Epitopvorläufer korrelierten mit der jeweils maximalen Inkorporation der Immununtereinheiten in 20S Proteasomen. Proteasomen, die aus Herzen von C57BL/6 Mäusen am Tag 4 nach CVB3 Infektion isoliert wurden, und 20S Proteasomen aus Herzen von A.BY/SnJ Mäusen, die am Tag 8 nach CVB3 Infektion isoliert wurden, generierten die jeweils größte Menge immunrelevanter Fragmente. Obwohl die Immununtereinheiten auch in den Herzen von A.BY/SnJ Mäusen am Tag 4 nach CVB3 Infektion schwach induziert waren, war keine verstärkte Generierung immunrelevanter Fragmente oder eine Erhöhung der Substratumsatzrate zu beobachten. Für die effizientere Generierung immunrelevanter Fragmente scheint ein Mindestanteil an 20S Proteasomen erforderlich, die wenigstens eine der Immununtereinheiten inkorporiert haben.

Der beobachtete unterschiedliche Verlauf der IFN- γ -Sekretion in den Milzen infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse konnte auch in den Herzen der Tiere detektiert werden (Szalay 2006b). Die zeitlich verzögerte Sekretion von IFN- γ in A.BY/SnJ Mäusen kann ursächlich für die verzögerte Induktion und Inkorporation der Immununtereinheiten in 20S Proteasomen in den Herzen von A.BY/SnJ Mäusen sein. Dadurch kann die effiziente Generierung und Präsentation immunrelevanter Fragmente und schließlich die Elimination infizierter Kardiomyozyten maßgeblich beeinflusst werden. IFN- γ vermittelt ferner die Rekrutierung von CD8⁺ T Zellen an die Stelle der Infektion durch die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen (Schroder 2004), die durch die reduzierte IFN- γ -Sekretion ebenfalls negativ beeinflusst werden kann.

Durch die kontrollierte Proteolyse zellulärer Schlüsselfaktoren ist das Ubiquitin-Proteasom-System an einer Vielzahl von Regulationsmechanismen beteiligt und kann neben der Generierung von MHC Klasse I restringierten Epitopen eine Funktion in der Regulation der Immunantwort haben (Ben-Neriah 2002). Eine Infektion mit CVB3 führt durch die Aktivierung des TLR3 zur Aktivierung des NF κ B Signaltransduktionsweges (Negishi 2008). Die Aktivität von NF κ B wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System kontrolliert (Ben-Neriah 2002). Die ubiquitinvermittelte Proteolyse durch Proteasomen führt in der Regel zu einer Degradation der Proteine. Die Proteolyse der Proteine p100 und p105 dagegen führt nicht zu einem vollständigen Abbau, sondern durch einen präzisen endoproteolytischen Schnitt zu der Generierung der Transkriptionsfaktoren p50 oder p52 (Lin 1998; Moorthy 2006), deren zelluläre Lokalisation durch die I κ B Proteine kontrolliert wird. Die Phosphorylierung von I κ B durch die IKK Proteine nach Aktivierung des Signaltransduktionsweges führt zur Ubiquitinierung und Degradation durch 26S Proteasomen

(Ben-Neriah 2002). Sowohl die Geschwindigkeit der Degradation von I κ B α als auch die Proteolyse von p105 war *in vitro* durch Immunoproteasomen erhöht (Visekruna 2006). Damit kann die Expression der Immununtereinheiten und deren Inkorporation in 20S Proteasomen am Ort der Infektion nicht nur in einer verbesserten Generierung antigener Determinanten resultieren, sondern auch die proinflammatorischen Bedingungen beeinflussen. Für eine über die Antigenpräsentation hinausgehende Funktion der Immununtereinheiten spricht auch die Expression der Immununtereinheiten in T Zellen, die in der Antigenpräsentation nur eine eingeschränkte Funktion haben, und das Gleichgewicht der T Zellsubpopulationen beeinflussen (Zaiss 2008).

Die verzögerte Induktion der Immununtereinheiten in Herzen von A.BY/SnJ Mäusen kann also neben der verzögerten effizienten Generierung MHC Klasse I restringierter Epitope eine verzögerte inflammatorische Reaktion zur Folge haben. Was letztlich zu dieser verzögerten Reaktion in A.BY/SnJ Mäusen führt, ist nicht bekannt. Aber auch Infektionen mit Ectromelia Virus oder Herpes simplex Virus Typ 1 resultieren in A.BY/SnJ Mäusen in chronischen Infektionen (Chaudri 2004; Kastrukoff 1986). Eine Theilerenzephalovirus induzierte Myelitis zeigt ebenfalls Unterschiede im Verlauf bei resistenten C57BL/6 und anfälligen SJL/J Mäusen. Eine unterschiedliche Aktivierung der Transkriptionsfaktoren p50 und c-jun resultierte in einer unterschiedlichen IFN- γ -Sekretion. In resistenten C57BL/6 Mäusen war die Aktivierung von p50 und c-jun lediglich in der frühen Phase der Infektion zu beobachten und führte zu einer starken IFN- γ -Expression in der akuten Phase der Infektion. In SJL/J Mäusen war die Induktion der Transkriptionsfaktoren in der frühen Phase weniger stark ausgeprägt, woraus eine spätere Induktion der IFN- γ -Sekretion resultierte (Gerhauser 2007).

Qualitative Unterschiede der generierten immunrelevanten Fragmente durch 20S Proteasomen konnten nicht detektiert werden und können somit nicht ursächlich für die unterschiedlichen Verlaufsformen der CVB3 Infektion in C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen sein. Dennoch hat das Ubiquitin-Proteasom-System Einfluss auf den Verlauf der CVB3 induzierten Myokarditis. Die Kinetiken der Assoziation von PA28 und 20S Proteasomen und die Assemblierungskinetik von Immunoproteasomen sichern in C57BL/6 Mäusen eine schnelle Anpassung an die CVB3 Infektion. Wie der Vergleich der Verlaufsformen der CVB3 induzierten Myokarditis in C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen zeigt, ist der schützende Effekt von IFN- γ von einer zeitlich optimalen Sekretion abhängig. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals in einem Tiermodell der direkte Zusammenhang zwischen Zytokinsekretion, Anpassung des Ubiquitin-Proteasom-Systems und dem Verlauf einer viralen Infektion gezeigt werden.

Literaturverzeichnis

- Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K & Ichihara A 1994, Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem.* 115: 257–269. Aki 1994.
- Akira S, Uematsu S & Takeuchi O 2006, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124: 783–801. Akira 2006.
- Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P & Becker JC 2006, Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol.* 126: 32–41. Andersen 2006.
- Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE & Knowlton KU 1999, Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med.* 5: 320–326. Badorff 1999.
- Baumeister W, Walz J, Zühl F & Seemüller E 1998, The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell.* 92: 367–380. Baumeister 1998.
- Bech-Otschir D, Helfrich A, Enenkel C, Consiglieri G, Seeger M, Holzhütter H, Dahlmann B & Kloetzel P 2009, Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome. *Nat Struct Mol Biol.* 16: 219–225. Bech-Otschir 2009.
- Beekman NJ, van Veelen PA, van Hall T, Neisig A, Sijts A, Camps M, Kloetzel PM, Neefjes JJ, Melief CJ & Ossendorp F 2000, Abrogation of CTL epitope processing by single amino acid substitution flanking the C-terminal proteasome cleavage site. *J Immunol.* 164: 1898–1905. Beekman 2000.
- Benham AM & Neefjes JJ 1997, Proteasome activity limits the assembly of MHC class I molecules after IFN-gamma stimulation. *J Immunol.* 159: 5896–5904. Benham 1997.
- Beninga J, Rock KL & Goldberg A 1998, Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem.* 273: 18734–18742. Beninga 1998.
- Ben-Neriah Y 2002, Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol.* 3: 20–26. Ben-Neriah 2002.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL & Wiley DC 1987, Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 329: 506–512. Bjorkman 1987.
- Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH & Kloetzel PM 1994, Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med.* 179: 901–909. Boes 1994.
- Bose S, Brooks P, Mason GG & Rivett AJ 2001, gamma-Interferon decreases the level of 26 S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation. *Biochem J.* 353: 291–297. Bose 2001.
- Bose S, Stratford FLL, Broadfoot KI, Mason GGF & Rivett AJ 2004, Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J.* 378: 177–184. Bose 2004.
- Bowie AG & Haga IR 2005, The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol.* 42: 859–867. Bowie 2005.
- Burgevin A, Saveanu L, Kim Y, Barilleau E, Kotturi M, Sette A, van Endert P & Peters B 2008, A detailed analysis of the murine TAP transporter substrate specificity. *PLoS ONE.* 3: e2402. Burgevin 2008.

- Busch DH & Pamer EG 1998, MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL. *J Immunol.* 160: 4441–4448. Busch 1998.
- Cascio P, Call M, Petre BM, Walz T & Goldberg AL 2002, Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *EMBO J.* 21: 2636–2645. Cascio 2002.
- Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL & Goldberg AL 2001, 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 20: 2357–2366. Cascio 2001.
- Chaudhri G, Panchanathan V, Buller RML, van den Eertwegh AJM, Claassen E, Zhou J, Chazal R de, Laman JD & Karupiah G 2004, Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 9057–9062. Chaudri 2004.
- Chen P & Hochstrasser M 1996, Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell.* 86: 961–972. Chen 1996.
- Chow LH, Beisel KW & McManus BM 1992, Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Invest.* 66: 24–31. Chow 1992.
- Claycomb WC, Lanson NA, Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A & Izzo NJ, Jr 1998, HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 2979–2984. Claycomb 1998.
- Cornell CT, Kiosses WB, Harkins S & Whitton JL 2007, Coxsackievirus B3 proteins directionally complement each other to downregulate surface major histocompatibility complex class I. *J Virol.* 81: 6785–6797. Cornell 2007.
- Cornell CT, Kiosses WB, Harkins S & Whitton JL 2006, Inhibition of protein trafficking by coxsackievirus b3: multiple viral proteins target a single organelle. *J Virol.* 80: 6637–6647. Cornell 2006.
- Dahlmann B, Kuehn L, Rutschmann M & Reinauer H 1985, Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle. *Biochem J.* 228: 161–170. Dahlmann 1985.
- de Jong AS, Visch H, Mattia F de, van Dommelen MM, Swarts HG, Luyten T, Callewaert G, Melchers WJ, Willems PH & van Kuppeveld FJ 2006, The coxsackievirus 2B protein increases efflux of ions from the endoplasmic reticulum and Golgi, thereby inhibiting protein trafficking through the Golgi. *J Biol Chem.* 281: 14144–14150. de Jong 2006.
- Deol P, Zaiss DM, Monaco JJ & Sijts AJ 2007, Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *J Immunol.* 178: 7557–7562. Deol 2007.
- Deonarain R, Cerullo D, Fuse K, Liu PP & Fish EN 2004, Protective role for interferon-beta in coxsackievirus B3 infection. *Circulation.* 110: 3540–3543. Deonarain 2004.
- Dick TP, Nussbaum AK, Deeg M, Heinemeyer W, Groll M, Schirle M, Keilholz W, Stevanović S, Wolf DH, Huber R, Rammensee HG & Schild H 1998, Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem.* 273: 25637–25646. Dick 1998.
- Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanović S, Schild H & Rammensee HG 1996, Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell.* 86: 253–262. Dick 1996.
- Driscoll J, Brown MG, Finley D & Monaco JJ 1993, MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature.* 365: 262–264. Driscoll 1993.

- Dubiel W, Pratt G, Ferrell K & Rechsteiner M 1992, Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem.* 267: 22369–22377. Dubiel 1992.
- Eggers M, Boes-Fabian B, Ruppert T, Kloetzel PM & Koszinowski UH 1995, The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J Exp Med.* 182: 1865–1870. Eggers 1995.
- Eleuteri AM, Kohanski RA, Cardozo C & Orlowski M 1997, Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *J Biol Chem.* 272: 11824–11831. Eleuteri 1997.
- Elkington R, Walker S, Crough T, Menzies M, Tellam J, Bharadwaj M & Khanna R 2003, Ex vivo profiling of CD8+T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol.* 77: 5226–5240. Elkington 2003.
- Elliott T & Williams A 2005, The optimization of peptide cargo bound to MHC class I molecules by the peptide-loading complex. *Immunol Rev.* 207: 89–99. Elliott 2005.
- Esfandiarei M & McManus BM 2008, Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol.* 3: 127–155. Esfandiarei 2008.
- Falk K, Rötzschke O, Stevanović S, Jung G & Rammensee HG 1991, Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature.* 351: 290–296. Falk 1991.
- Feldman AM & McNamara D 2000, Myocarditis. *N Engl J Med.* 343: 1388–1398. Feldman 2000.
- Feuer R, Mena I, Pagarigan R, Slifka MK & Whitton JL 2002, Cell cycle status affects coxsackievirus replication, persistence, and reactivation in vitro. *J Virol.* 76: 4430–4440. Feuer 2002.
- Förster A, Masters EI, Whitby FG, Robinson H & Hill CP 2005, The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell.* 18: 589–599. Förster 2005.
- Gaczynska M, Rock KL & Goldberg AL 1993, Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature.* 365: 264–267. Gaczynska 1993.
- Gallimore A, Hombach J, Dumrese T, Rammensee HG, Zinkernagel RM & Hengartner H 1998, A protective cytotoxic T cell response to a subdominant epitope is influenced by the stability of the MHC class I/peptide complex and the overall spectrum of viral peptides generated within infected cells. *Eur J Immunol.* 28: 3301–3311. Gallimore 1998.
- Gebhard JR, Perry CM, Harkins S, Lane T, Mena I, Asensio VC, Campbell IL & Whitton JL 1998, Coxsackievirus B3-induced myocarditis: perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance. *Am J Pathol.* 153: 417–428. Gebhard 1998.
- Gerhauser I, Ulrich R, Alldinger S & Baumgärtner W 2007, Induction of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB as a prerequisite for disease development in susceptible SJL/J mice after theiler murine encephalomyelitis. *J. Neuropathol Exp Neurol.* 66: 809–818. Gerhauser 2007.
- Goldberg AL, Cascio P, Saric T & Rock KL 2002, The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol.* 39: 147–164. Goldberg 2002.
- Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH & Kloetzel PM 1996, A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature.* 381: 166–168. Groettrup 1996.
- Groettrup M, Standera S, Stohwasser R & Kloetzel PM 1997, The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 8970–8975. Groettrup 1997.

- Groll M & Huber R 2004, Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim Biophys Acta*. 1695: 33–44. Groll 2004.
- Groll M, Bajorek M, Köhler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH & Finley D 2000, A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol*. 7: 1062–1067. Groll 2000.
- Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD & Huber R 1997, Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 386: 463–471. Groll 1997.
- Hallermalm K, Seki K, Wei C, Castelli C, Rivoltini L, Kiessling R & Levitskaya J 2001, Tumor necrosis factor- α induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. *Blood*. 98: 1108–1115. Hallermalm 2001.
- Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart P, Du Pasquier RA & Pantaleo G 2006, Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev*. 211: 236–254. Harari 2006.
- Heink S, Ludwig D, Kloetzel P & Krüger E 2005, IFN- γ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 9241–9246. Heink 2005.
- Hendil KB, Khan S & Tanaka K 1998, Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J*. 332 (Pt 3): 749–754. Hendil 1998.
- Henke A, Huber S, Stelzner A & Whitton JL 1995, The role of CD8⁺ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol*. 69: 6720–6728. Henke 1995.
- Hershko A & Ciechanover A 1998, The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 67: 425–479. Hershko 1998.
- Holtappels R, Thomas D, Podlech J & Reddehase MJ 2002, Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2d haplotype. *J Virol*. 76: 151–164. Holtappels 2002.
- Honda K & Taniguchi T 2006, IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*. 6: 644–658. Honda 2006.
- Huber S, Polgar J, Moraska A, Cunningham M, Schwimbeck P & Schultheiss P 1993, T lymphocyte responses in CVB3-induced murine myocarditis. *Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum* 88: 67–78. Huber 1993.
- Huber S, Shi C & Budd RC 2002, Gammadelta T cells promote a Th1 response during coxsackievirus B3 infection in vivo: role of Fas and Fas ligand. *J Virol*. 76: 6487–6494. Huber 2002.
- Kastrukoff LF, Lau AS & Puterman ML 1986, Genetics of natural resistance to herpes simplex virus type 1 latent infection of the peripheral nervous system in mice. *J Gen Virol*. 67 (Pt 4): 613–621. Kastrukoff 1986.
- Kawai C 1999, From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation*. 99: 1091–1100. Kawai 1999.
- Kawai T & Akira S 2006, Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*. 7: 131–137. Kawai 2006.
- Kemball CC, Harkins S & Whitton JL 2008, Enumeration and functional evaluation of virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in lymphoid and peripheral sites of coxsackievirus B3 infection. *J Virol*. 82: 4331–4342. Kemball 2008.

- Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM & Goldberg AL 1999, The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem.* 274: 3363–3371. Kisselev 1999.
- Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G & Kandolf R 1992, Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 314–318. Klingel 1992.
- Klingel K, Schnorr J, Sauter M, Szalay G & Kandolf R 2003, beta2-microglobulin-associated regulation of interferon-gamma and virus-specific immunoglobulin G confer resistance against the development of chronic coxsackievirus myocarditis. *Am J Pathol.* 162: 1709–1720. Klingel 2003.
- Kloetzel PM 2004, Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol.* 5: 661–669. Kloetzel 2004.
- Kloetzel PM 2001, Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 179–187. Kloetzel 2001.
- Knowlton JR, Johnston SC, Whitby FG, Realini C, Zhang Z, Rechsteiner M & Hill CP 1997, Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature.* 390: 639–643. Knowlton 1997.
- Kopp F, Dahlmann B & Kuehn L 2001, Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20 S complexes and PA28alphabeta activator: ultrastructure and peptidase activities. *J Mol Biol.* 313: 465–471. Kopp 2001.
- Kuckelkorn U, Frentzel S, Kraft R, Kostka S, Groettrup M & Kloetzel PM 1995, Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *Eur J Immunol.* 25: 2605–2611. Kuckelkorn 1995.
- Kuckelkorn U, Ruppert T, Strehl B, Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Lamer S, Prinz I, Drung I, Kloetzel P, Kaufmann SHE & Steinhoff U 2002, Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med.* 195: 983–990. Kuckelkorn 2002.
- Laemmli UK 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680–685. Laemmli 1970.
- Lanzavecchia A & Sallusto F 2000, Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science.* 290: 92–97. Lanzavecchia 2000.
- Lay MDH, Zhang L, Ribeiro RM, Mueller SN, Belz GT & Davenport MP 2009, Kinetics of major histocompatibility class I antigen presentation in acute infection. *J Immunol.* 182: 902–911. Lay 2009.
- Li Y, Bourlet T, Andreoletti L, Mosnier JF, Peng T, Yang Y, Archard LC, Pozzetto B & Zhang H 2000, Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 101: 231–234. Li 2000.
- Lin L, DeMartino GN & Greene WC (1998) Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell* 92: Lin L, DeMartino GN & Greene WC 1998, Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell.* 92: 819–828. Lin 1998.
- Liu C, Li X, Thompson D, Wooding K, Chang T, Tang Z, Yu H, Thomas PJ & DeMartino GN 2006, ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome. *Mol Cell.* 24: 39–50. Liu 2006.

- Ljunggren HG, Pääbo S, Cochet M, Kling G, Kourilsky P & Kärre K 1989, Molecular analysis of H-2-deficient lymphoma lines. Distinct defects in biosynthesis and association of MHC class I heavy chains and beta 2-microglobulin observed in cells with increased sensitivity to NK cell lysis. *J Immunol.* 142: 2911–2917. Ljunggren 1989.
- Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W & Huber R 1995, Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science.* 268: 533–539. Löwe 1995.
- Luo H, Zhang J, Cheung C, Suarez A, McManus BM & Yang D 2003, Proteasome inhibition reduces coxsackievirus B3 replication in murine cardiomyocytes. *Am J Pathol.* 163: 381–385. Luo 2003a.
- Luo H, Zhang J, Dastvan F, Yanagawa B, Reidy MA, Zhang HM, Yang D, Wilson JE & McManus BM 2003, Ubiquitin-dependent proteolysis of cyclin D1 is associated with coxsackievirus-induced cell growth arrest. *J Virol.* 77: 1–9. Luo 2003b.
- Lyman MA, Lee H, Kang BS, Kang H & Kim BS 2002, Capsid-specific cytotoxic T lymphocytes recognize three distinct H-2D(b)-restricted regions of the BeAn strain of Theiler's virus and exhibit different cytokine profiles. *J Virol.* 76: 3125–3134. Lyman 2002.
- Ma CP, Slaughter CA & DeMartino GN 1992, Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem.* 267: 10515–10523. Ma 1992.
- Mandl S, Sigal LJ, Rock KL & Andino R 1998, Poliovirus vaccine vectors elicit antigen-specific cytotoxic T cells and protect mice against lethal challenge with malignant melanoma cells expressing a model antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 8216–8221. Mandl 1998.
- Medzhitov R 2007, Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449: 819–826. Medzhitov 2007.
- Momburg F, Roelse J, Hämmerling GJ & Neefjes JJ 1994, Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med.* 179: 1613–1623. Momburg 1994.
- Moorthy AK, Savinova OV, Ho JQ, Wang VY, Vu D & Ghosh G 2006, The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *EMBO J.* 25: 1945–1956. Moorthy 2006.
- Morel S, Lévy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Keppler M, Peitrequin AL, Monsarrat B, Van Velthoven R, Cerottini JC, Boon T, Gairin JE & Van den Eynde BJ 2000, Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity.* 12: 107–117. Morel 2000.
- Moutaftsi M, Peters B, Pasquetto V, Tschärke DC, Sidney J, Bui H, Grey H & Sette A 2006, A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T(CD8+)-cell responses to vaccinia virus. *Nat Biotechnol.* 24: 817–819. Moutaftsi 2006.
- Munks MW, Gold MC, Zajac AL, Doom CM, Morello CS, Spector DH & Hill AB 2006, Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. *J Immunol.* 176: 3760–3766. Munks 2006.
- Murata S, Udonon H, Tanahashi N, Hamada N, Watanabe K, Adachi K, Yamano T, Yui K, Kobayashi N, Kasahara M, Tanaka K & Chiba T 2001, Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta. *EMBO J.* 20: 5898–5907. Murata 2001.
- Neefjes J, Gottfried E, Roelse J, Grommé M, Obst R, Hämmerling GJ & Momburg F 1995, Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *Eur J Immunol.* 25: 1133–1136. Neefjes 1995.

- Negishi H, Osawa T, Ogami K, Ouyang X, Sakaguchi S, Koshiba R, Yanai H, Seko Y, Shitara H, Bishop K, Yonekawa H, Tamura T, Kaisho T, Taya C, Taniguchi T & Honda K 2008, A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 20446–20451. Negishi 2008.
- Niedermann G, Butz S, Ihlenfeldt HG, Grimm R, Lucchiari M, Hoschützky H, Jung G, Maier B & Eichmann K 1995, Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity.* 2: 289–299. Niedermann 1995.
- Opavsky MA, Penninger J, Aitken K, Wen WH, Dawood F, Mak T & Liu P 1999, Susceptibility to myocarditis is dependent on the response of alphabeta T lymphocytes to coxsackieviral infection. *Circ Res.* 85: 551–558. Opavsky 1999.
- Orlowski M & Wilk S 2000, Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys.* 383: 1–16. Orlowski 2000.
- Pamer E & Cresswell P 1998, Mechanisms of MHC class I–restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 16: 323–358. Pamer 1998.
- Peters B, Bulik S, Tampe R, van Endert PM & Holzhütter H 2003, Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J Immunol.* 171: 1741–1749. Peters 2003.
- Pichlmair A & Reis e Sousa C 2007, Innate recognition of viruses. *Immunity.* 27: 370–383. Pichlmair 2007.
- Pickart CM & Cohen RE 2004, Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 177–187. Pickart 2004.
- Preckel T, Fung-Leung WP, Cai Z, Vitiello A, Salter-Cid L, Winqvist O, Wolfe TG, Von Herrath M, Angulo A, Ghazal P, Lee JD, Fourie AM, Wu Y, Pang J, Ngo K, Peterson PA, Früh K & Yang Y 1999, Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28^{-/-} mice. *Science.* 286: 2162–2165. Preckel 1999.
- Princiotta MF, Finzi D, Qian S, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgereit F, Bannink JR & Yewdell JW 2003, Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity.* 18: 343–354. Princiotta 2003.
- Pummerer C, Berger P, Frühwirth M, Ofner C & Neu N 1991, Cellular infiltrate, major histocompatibility antigen expression and immunopathogenic mechanisms in cardiac myosin-induced myocarditis. *Lab Invest.* 65: 538–547. Pummerer 1991.
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA & Stevanović S 1999, SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics.* 50: 213–219. Rammensee 1999.
- Rammensee HG, Friede T & Stevanović S 1995, MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics.* 41: 178–228. Rammensee 1995.
- Raschke WC, Baird S, Ralph P & Nakoinz I 1978, Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* 15: 261–267. Raschke 1978.
- Realini C, Dubiel W, Pratt G, Ferrell K & Rechsteiner M 1994, Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem.* 269: 20727–20732. Realini 1994.
- Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijfhout JW & Neeffes J 2004, A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity.* 20: 495–506. Reits 2004.

- Salter RD, Howell DN & Cresswell P 1985, Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics*. 21: 235–246. Salter 1985.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T Molecular cloning: A laboratory manual. Sambrook 1989. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Schägger H & Jagow G von 1987, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166: 368–379. Schägger 1987.
- Schmidtke G, Eggers M, Ruppert T, Groettrup M, Koszinowski UH & Kloetzel PM 1998, Inactivation of a defined active site in the mouse 20S proteasome complex enhances major histocompatibility complex class I antigen presentation of a murine cytomegalovirus protein. *J Exp Med*. 187: 1641–1646. Schmidtke 1998.
- Schmidtke G, Kraft R, Kostka S, Henklein P, Frömmel C, Löwe J, Huber R, Kloetzel PM & Schmidt M 1996, Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J*. 15: 6887–6898. Schmidtke 1996.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T & Hume DA 2004, Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 75: 163–189. Schroder 2004.
- Schwarz K, Eggers M, Soza A, Koszinowski UH, Kloetzel PM & Groettrup M 2000, The proteasome regulator PA28alpha/beta can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition. *Eur J Immunol*. 30: 3672–3679. Schwarz 2000a.
- Schwarz K, van Den Broek M, Kostka S, Kraft R, Soza A, Schmidtke G, Kloetzel PM & Groettrup M 2000, Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J Immunol*. 165: 768–778. Schwarz 2000b.
- Seifert U, Liermann H, Racanelli V, Halenius A, Wiese M, Wedemeyer H, Ruppert T, Rispeter K, Henklein P, Sijts A, Hengel H, Kloetzel P & Rehmann B 2004, Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest*. 114: 250–259. Seifert 2004.
- Seko Y, Takahashi N, Yagita H, Okumura K & Yazaki Y 1997, Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3. *J Pathol*. 183: 105–108. Seko 1997.
- Sette A, Vitiello A, Rehman B, Fowler P, Nayersina R, Kast WM, Melief CJ, Oseroff C, Yuan L, Ruppert J, Sidney J, del Guercio MF, Southwood S, Kubo RT, Chesnut RW, Grey HM & Chisari FV 1994, The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol*. 153: 5586–5592. Sette 1994.
- Shimbara N, Nakajima H, Tanahashi N, Ogawa K, Niwa S, Uenaka A, Nakayama E & Tanaka K 1997, Double-cleavage production of the CTL epitope by proteasomes and PA28: role of the flanking region. *Genes Cells*. 2: 785–800. Shimbara 1997.
- Shin E, Seifert U, Kato T, Rice CM, Feinstone SM, Kloetzel P & Rehmann B 2006, Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *J Clin Invest*. 116: 3006–3014. Shin 2006.
- Si X, Gao G, Wong J, Wang Y, Zhang J & Luo H 2008, Ubiquitination is required for effective replication of coxsackievirus B3. *PLoS ONE*. 3: e2585. Si 2008.
- Sibille C, Gould KG, Willard-Gallo K, Thomson S, Rivett AJ, Powis S, Butcher GW & De Baetselier P 1995, LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr Biol*. 5: 923–930. Sibille 1995.

- Sijts AJ, Ossendorp F, Mengedé EA, van den Elsen PJ & Melief CJ 1994, Immunodominant mink cell focus-inducing murine leukemia virus (MuLV)-encoded CTL epitope, identified by its MHC class I-binding motif, explains MuLV-type specificity of MCF-directed cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 152: 106–116. Sijts 1994.
- Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U & Kloetzel PM 2000, Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med.* 191: 503–514. Sijts 2000a.
- Sijts AJ, Standera S, Toes RE, Ruppert T, Beekman NJ, van Veelen PA, Ossendorp FA, Melief CJ & Kloetzel PM 2000, MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J Immunol.* 164: 4500–4506. Sijts 2000b.
- Slifka MK, Pagarigan R, Mena I, Feuer R & Whitton JL 2001, Using recombinant coxsackievirus B3 to evaluate the induction and protective efficacy of CD8⁺ T cells during picornavirus infection. *J Virol.* 75: 2377–2387. Slifka 2001.
- Song X, Kampen J von, Slaughter CA & DeMartino GN 1997, Relative functions of the alpha and beta subunits of the proteasome activator, PA28. *J Biol Chem.* 272: 27994–28000. Song 1997.
- Springer S, Doring K, Skipper JC, Townsend AR & Cerundolo V 1998, Fast association rates suggest a conformational change in the MHC class I molecule H-2Db upon peptide binding. *Biochemistry.* 37: 3001–3012. Springer 1998.
- Stohwasser R, Salzmann U, Giesebrecht J, Kloetzel PM & Holzhütter HG 2000, Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem.* 267: 6221–6230. Stohwasser 2000.
- Strehl B, Joeris T, Rieger M, Visekruna A, Textoris-Taube K, Kaufmann SH, Kloetzel P, Kuckelkorn U & Steinhoff U 2006, Immunoproteasomes are essential for clearance of *Listeria monocytogenes* in nonlymphoid tissues but not for induction of bacteria-specific CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 177: 6238–6244. Strehl 2006.
- Strehl B, Seifert U, Krüger E, Heink S, Kuckelkorn U & Kloetzel P 2005, Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev.* 207: 19–30. Strehl 2005.
- Strehl B, Textoris-Taube K, Jäkel S, Voigt A, Henklein P, Steinhoff U, Kloetzel P & Kuckelkorn U 2008, Antitopes define preferential proteasomal cleavage site usage. *J Biol Chem.* 283: 17891–17897. Strehl 2008.
- Sun Y, Sijts AJAM, Song M, Janek K, Nussbaum AK, Kral S, Schirle M, Stevanovic S, Paschen A, Schild H, Kloetzel P & Schadendorf D 2002, Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Cancer Res.* 62: 2875–2882. Sun 2002.
- Szalay G, Meiners S, Voigt A, Lauber J, Spieth C, Speer N, Sauter M, Kuckelkorn U, Zell A, Klingel K, Stangl K & Kandolf R 2006, Ongoing coxsackievirus myocarditis is associated with increased formation and activity of myocardial immunoproteasomes. *Am J Pathol.* 168: 1542–1552. Szalay 2006a.
- Szalay G, Sauter M, Hald J, Weinzierl A, Kandolf R & Klingel K 2006, Sustained nitric oxide synthesis contributes to immunopathology in ongoing myocarditis attributable to interleukin-10 disorders. *Am J Pathol.* 169: 2085–2093. Szalay 2006b.
- Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB & Tanaka K 2000, Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem.* 275: 14336–14345. Tanahashi 2000.

- Textoris-Taube K, Henklein P, Pollmann S, Bergann T, Weisshoff H, Seifert U, Drung I, Mügge C, Sijts A, Kloetzel P & Kuckelkorn U 2007, The N-terminal flanking region of the TRP2360-368 melanoma antigen determines proteasome activator PA28 requirement for epitope liberation. *J Biol Chem.* 282: 12749–12754. Textoris-Taube 2007.
- Theobald M, Ruppert T, Kuckelkorn U, Hernandez J, Häussler A, Ferreira EA, Liewer U, Biggs J, Levine AJ, Huber C, Koszinowski UH, Kloetzel PM & Sherman LA 1998, The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. *J Exp Med.* 188: 1017–1028. Theobald 1998.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M & Pickart CM 2000, Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19: 94–102. Thrower 2000.
- Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Müller J, Schönfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG & Schild H 2001, Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med.* 194: 1–12. Toes 2001.
- Tourdot S, Scardino A, Saloustrou E, Gross DA, Pascolo S, Cordopatis P, Lemonnier FA & Kosmatopoulos K 2000, A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2. 1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *Eur J Immunol.* 30: 3411–3421. Tourdot 2000.
- Tscharke DC, Karupiah G, Zhou J, Palmore T, Irvine KR, Haeryfar SMM, Williams S, Sidney J, Sette A, Bennink JR & Yewdell JW 2005, Identification of poxvirus CD8⁺ T cell determinants to enable rational design and characterization of smallpox vaccines. *J Exp Med.* 201: 95–104. Tscharke 2005.
- Uebel S, Kraas W, Kienle S, Wiesmüller KH, Jung G & Tampé R 1997, Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 8976–8981. Uebel 1997.
- Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N & Tsukihara T 2002, The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure.* 10: 609–618. Unno 2002.
- van der Burg SH, Visseren MJ, Brandt RM, Kast WM & Melief CJ 1996, Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability. *J Immunol.* 156: 3308–3314. van der Burg 1996.
- van Hall T, Sijts A, Camps M, Offringa R, Melief C, Kloetzel PM & Ossendorp F 2000, Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J Exp Med.* 192: 483–494. van Hall 2000.
- van Stipdonk MJ, Lemmens EE & Schoenberger SP 2001, Naïve CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol.* 2: 423–429. van Stipdonk 2001.
- Visekruna A, Joeris T, Seidel D, Kroesen A, Loddenkemper C, Zeitz M, Kaufmann SHE, Schmidt-Ullrich R & Steinhoff U 2006, Proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. *J Clin Invest.* 116: 3195–3203. Visekruna 2006.
- Weinzierl AO, Szalay G, Wolburg H, Sauter M, Rammensee H, Kandolf R, Stevanović S & Klingel K 2008, Effective chemokine secretion by dendritic cells and expansion of cross-presenting CD4-/CD8⁺ dendritic cells define a protective phenotype in the mouse model of coxsackievirus myocarditis. *J Virol.* 82: 8149–8160. Weinzierl 2008.
- Weissman AM 2001, Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 169–178. Weissman 2001.

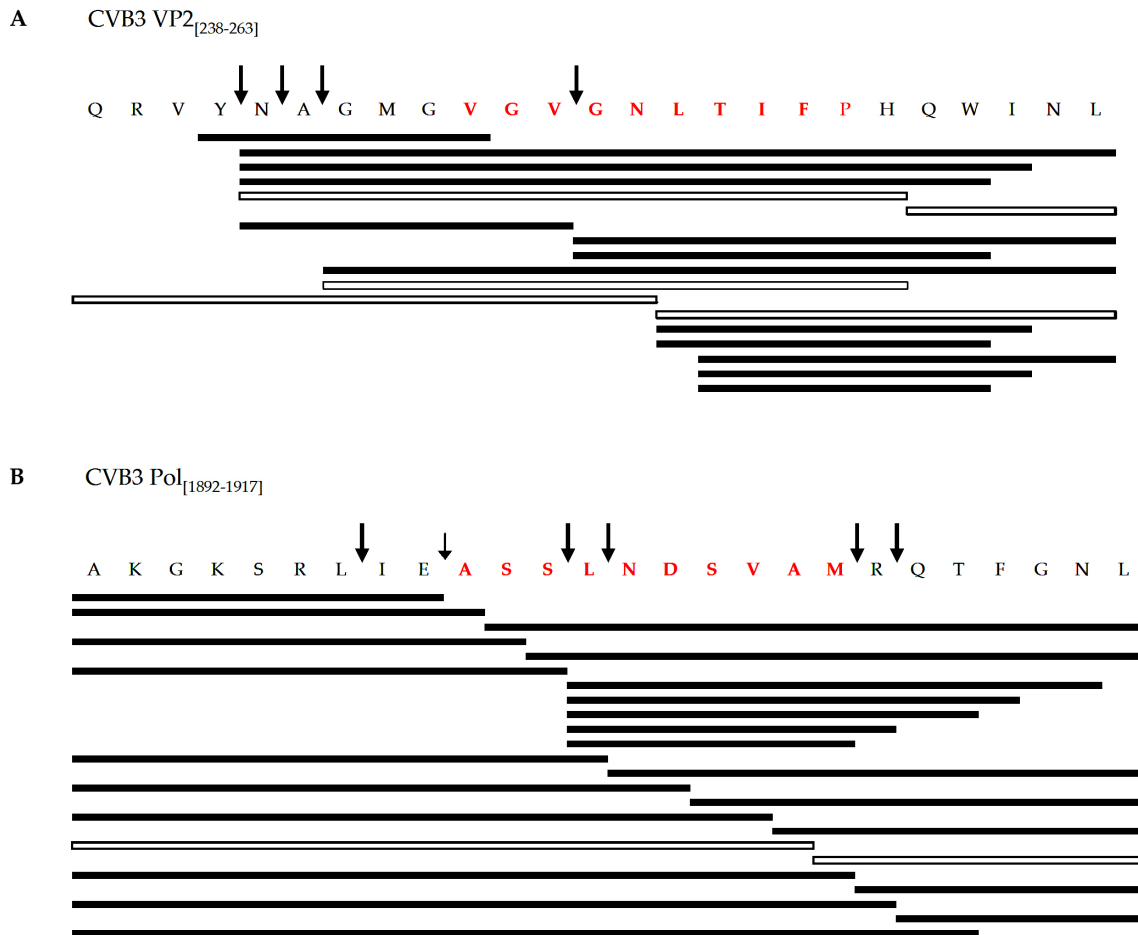
- Wessely R, Klingel K, Knowlton KU & Kandolf R 2001, Cardiosselective infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication. *Circulation*. 103: 756–761. Wessely 2001.
- Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC & Hill CP 2000, Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature*. 408: 115–120. Whitby 2000.
- Whitton JL, Cornell CT & Feuer R 2005, Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol*. 3: 765–776. Whitton 2005.
- Wilk S & Orlowski M 1983, Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem*. 40: Wilk 1983.
- Wipke BT, Jameson SC, Bevan MJ & Pamer EG 1993, Variable binding affinities of listeriolysin O peptides for the H-2Kd class I molecule. *Eur J Immunol*. 23: 2005–2010. Wipke 1993.
- Yewdell JW 2006, Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunity*. 25: 533–543. Yewdell 2006.
- Yewdell JW & Bennink JR 1999, Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol*. 17: 51–88. Yewdell 1999.
- Yewdell JW & Del Val M 2004, Immunodominance in TCD8+ responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity*. 21: 149–153. Yewdell 2004.
- Zaiss DMW, Graaf N de & Sijts AJAM 2008, The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion. *Infect Immun*. 76: 1207–1213. Zaiss 2008.
- Zhang Z, Clawson A, Realini C, Jensen CC, Knowlton JR, Hill CP & Rechsteiner M 1998, Identification of an activation region in the proteasome activator REGalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 2807–2811. Zhang 1998.

Abkürzungsverzeichnis

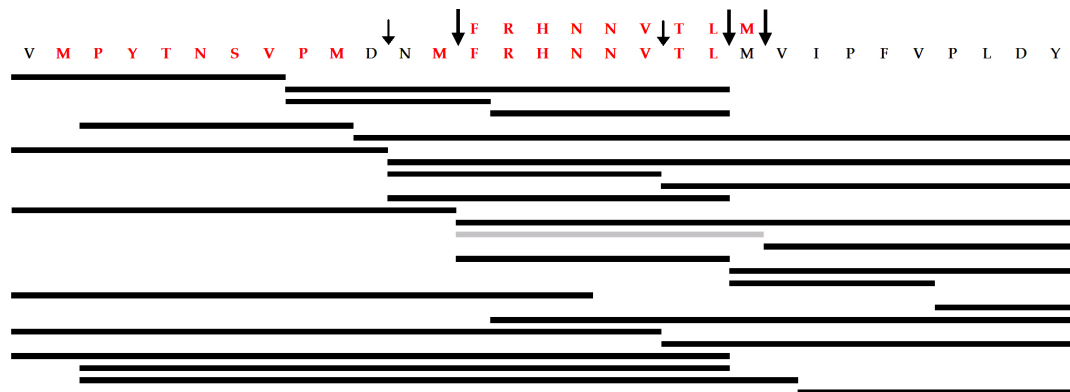
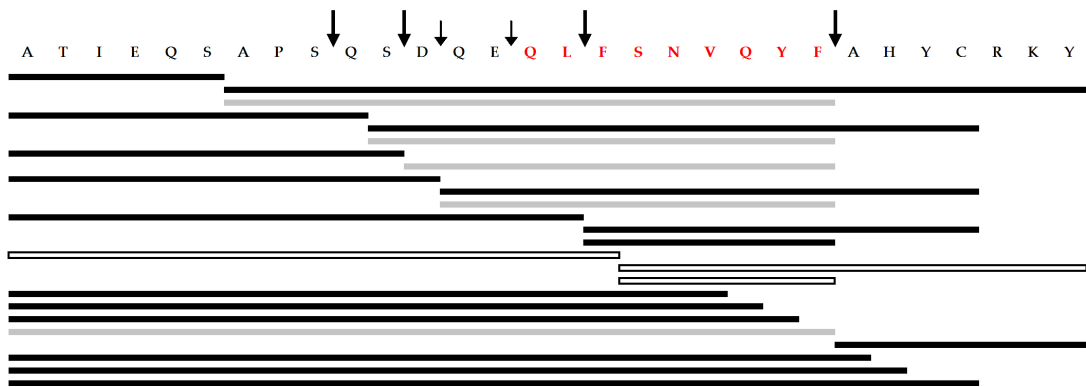
Abb.	Abbildung
AMC	7-Amido-4-methylcoumarin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	electro spray ionization
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	fast protein liquid chromatography
GST	Glutathion-S-Transferase
H-2	histocompatibility-2
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonat
HPLC	high performance liquid chromatography
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthio- β -galaktosid
IRF	interferon-regulatory factor
ISG	interferon stimulated gene
Kb	Kilobase
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MACS	magnetic activated cell sorting
MALDI	matrix assisted laser desorption / ionization
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA

MW	molecular weight
Na-Azid	Natriumazid
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
Nonidet P-40	Octylphenolpoly(ethylenglycolether)
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PFU	plaque forming unit
PGPH Aktivität	peptidylglutamyl-peptidhydrolysierende Aktivität
PKR	Proteinkinase R
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
poly (I:C)	polyinosinic acid polycytidylic acid
PRR	pathogen recognition receptors
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEB	Enterotoxin B aus <i>Staphylococcus aureus</i>
Suc-LLVY-AMC	3-Carboxy-propionyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-AMC
TAP	transporter associated with antigen processing
TcR	T cell Receptor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	toll like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TOF	time of flight
Tricin	N-[Tri(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat
U/min	Umdrehung pro Minute
U/ml	Unit pro Milliliter
UTR	untranslated region
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
Z-GGL-AMC	Benzyloxycarbonyl-Glycin-Glycin-Leucin-AMC
β ₂ M	β ₂ Mikroglobulin
λ	Wellenlänge

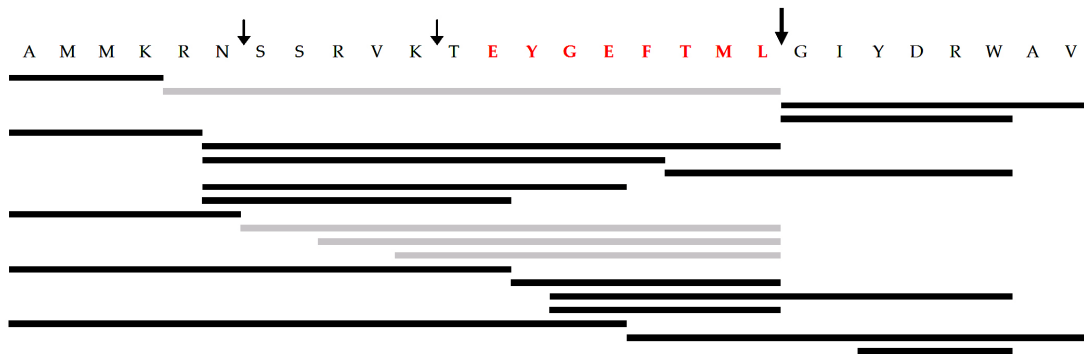
Anhang



Anhang Abb. 1. Produkte der *in vitro* Degradationsexperimente der Polypeptide CVB3 VP2_[238-263] und CVB3 Pol_[1892-1917] durch 20S Proteasomen. Die CVB3 Polypeptidsubstrate CVB3 VP2_[238-263] (**A**) und CVB3 Pol_[1892-1917] (**B**) wurden jeweils mit Standard- und Immunoproteasomen und zusätzlich jeweils in Anwesenheit von PA28 inkubiert. Die entstandenen Produkte wurden in der *reversed phase* HPLC separiert und massenspektrometrisch analysiert. Fragmente, die ausschließlich in Reaktionsansätzen mit PA28 detektiert wurden, sind weiß dargestellt. Große Pfeile kennzeichnen Schnittstellen, die durch Immunoproteasomen häufiger genutzt wurden als durch Standardproteasomen, kleine Pfeile bedeuten Schnittstellen, die im Vergleich durch Immunoproteasomen weniger genutzt wurden. Die potentiellen CVB3 Epitope sind **rot** hervorgehoben.

A CVB3 VP2_[272-302]**B** CVB3 P2C_[1161-1190]

Anhang Abb. 2. Produkte der *in vitro* Degradationsexperimente der Polypeptide CVB3 VP2_[272-302] und CVB3 P2C_[1161-1190] durch 20S Proteasomen. Die CVB3 Polypeptide CVB3 VP2_[272-302] (A) und CVB3 P2C_[1161-1190] (B) wurden als Substrate in *in vitro* Degradationsexperimenten mit Standard- und Immunoproteasomen, und mit und ohne PA28, eingesetzt. Die Trennung der Abbauprodukte erfolgte in der *reversed phase* HPLC mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der Produkte. Fragmente, die PA28-abhängig generiert wurden, sind weiß dargestellt, immunrelevante Fragmente, also potentielle CVB3 Epitope oder deren N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide, in hellgrau. Große Pfeile kennzeichnen Schnittstellen, die durch Immunoproteasomen häufiger genutzt wurden als durch Standardproteasomen, kleine Pfeile bedeuten Schnittstellen, die im Vergleich durch Immunoproteasomen weniger genutzt wurden. Die potentiellen Epitope in der Aminosäuresequenz der CVB3 Polypeptidsubstrate sind **rot** hervorgehoben.

A CVB3 3C_[1549-1576]**B** CVB3 Pol_[2158-2185]

Anhang Abb. 3. Produkte der *in vitro* Degradationsexperimente der Polypeptide CVB3 3C_[1549-1576] und CVB3 Pol_[2158-2185] durch 20S Proteasomen. Die CVB3 Polypeptide CVB3 3C_[1549-1576] (A) und CVB3 Pol_[2158-2185] (B) wurden als Substrate in *in vitro* Degradationsexperimenten mit Standard- und Immunoproteasomen, und mit und ohne PA28, eingesetzt. Die Trennung der Abbauprodukte erfolgte in der *reversed phase* HPLC mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der Produkte. Fragmente, die PA28-abhängig generiert wurden, sind weiß dargestellt, immunrelevante Fragmente, also potentielle CVB3 Epitope oder deren N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide, in hellgrau. Große Pfeile kennzeichnen Schnittstellen, die durch Immunoproteasomen häufiger genutzt wurden als durch Standardproteasomen, kleine Pfeile bedeuten Schnittstellen, die im Vergleich durch Immunoproteasomen weniger genutzt wurden. Die potentiellen Epitope in der Aminosäuresequenz der CVB3 Polypeptidsubstrate sind **rot** hervorgehoben.